

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II



TESIS DOCTORAL

Evaluación de las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de cebolla procesada como ingrediente funcional *in vitro* y en modelo animal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Clara Colina Coca

Directoras

**Concepción Sánchez-Moreno González
Begoña de Ancos Siguero**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
ANTIINFLAMATORIAS, ANTIOXIDANTES E
HIPOLIPIDÉMICAS DE CEBOLLA PROCESADA COMO
INGREDIENTE FUNCIONAL *IN VITRO* Y EN UN MODELO
ANIMAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

CLARA COLINA COCA

Directores:

Dra. Concepción Sánchez-Moreno González

Dra. Begoña de Ancos Siguero

Madrid, 2017



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS,
ANTIOXIDANTES E HIPOLIPIDÉMICAS DE CEBOLLA
PROCESADA COMO INGREDIENTE FUNCIONAL *IN VITRO* Y EN
UN MODELO ANIMAL**

**Trabajo de investigación presentado por Clara Colina Coca para optar al grado
de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)**

Vº Bueno de los directores:

Vº Bueno del doctorando:

Dra. Concepción Sánchez-Moreno González

Clara Colina Coca

Dra. Begoña de Ancos Siguero

Madrid, 2017

La **Dra. Concepción Sánchez-Moreno González**, Investigador Científico y la **Dra. Begoña De Ancos Sigüero**, Investigador Científico, del Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) certifican que el trabajo de investigación titulado:

“Evaluación de las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de cebolla procesada como ingrediente funcional *in vitro* y en un modelo animal”

presentado por **Clara Colina Coca** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Fdo:

Dra. Concepción Sánchez-Moreno González

Fdo:

Dra. Begoña De Ancos Sigüero

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSE ANTONIO NOVAIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA

TELS.: 91 562 29 00



ER-0366/2008

ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-15910 (subprograma ALI) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

A mis padres

A mi hermano

“La decisión es tuya”
–Lukis–

Agradecimientos

Recientes investigaciones en el campo de la física cuántica postulan que se está produciendo una aceleración del tiempo y continuará haciéndolo, hecho por el cual podría explicarse que parece que fue ayer cuando empecé mi camino en el mundo de la investigación, y sin embargo han pasado más de cinco años. Años muy intensos realizando este trabajo que me ha llenado plenamente, me ha hecho crecer profesional y personalmente, pero todo ello no hubiese sido posible sin la ayuda y el apoyo de todas las personas que se han ido cruzando en mi camino y aquellas que siempre han estado ahí. Razón por la cuál me gustaría dedicar mis agradecimientos a todas y cada una de estas personas.

En primer lugar quería agradecer profundamente a mis directoras de Tesis, la Dra. Concepción Sánchez-Moreno y la Dra. Begoña de Ancos el haberme dado la oportunidad de empezar mi camino en el mundo de la investigación, de confiar en mí para realizar este trabajo, de guiarme y apoyarme incondicionalmente, del tiempo y el interés que me han dedicado durante esta etapa. Ha sido un gran placer aprender de vuestra profesionalidad, experiencia y conocimientos.

La vida es cambio, todo es temporal, unos se van y otros vienen. Por todo ello también quiero extender mis agradecimientos a todos aquellos que han formado o forman parte del grupo de investigación. A la Dra. Lucía Plaza por todo el apoyo y la infinita paciencia que tuviste conmigo, gracias por transmitirme tus conocimientos, los consejos y toda la ayuda que necesité con la mejor de tus sonrisas y buena disposición. De la misma manera muchas gracias a Diana González, compañera de camino pre-doctoral, gracias por el compañerismo que te caracteriza, por todos esos buenos momentos y risas que hemos compartido en los cafés, en el laboratorio y con nuestras queridas ratillas. Gracias a Lucía por la buena predisposición para echarnos un cable en todo momento, especialmente en la etapa ratuna, por tu simpatía y por las entretenidas tertulias en todo momento. A Eva Dorta, gracias por tu gran amistad, consejos y apoyo incondicional, tanto dentro del laboratorio como fuera.

Como no, dar las gracias a “Evita” que me ofreciste tu amistad cuando

Ulegué aquí, por toda tu simpatía y buenas palabras, y sobre todo tu contagioso optimismo. Quería agradecer especialmente el apoyo fundamental y amistad de Marta Mesías, Asier De la fuente, María Hidalgo y María Blanch, grandes pilares a lo largo de toda esta etapa, por todo lo que hemos compartido, momentos llenos de alegría y risas, y momentos de debilidad, no tengo palabras para expresar el profundo agradecimiento que siento por todo lo que me habéis aportado como profesionales y como personas. A Cande, Mauri, Lorena, Cris, Cielo... por las risas, los cafés y las inolvidables cañas de los viernes.

A todos mis compañeros de despacho: Fer, Sílvia, Marta, María...gracias por ser tan buenos compañeros. Gracias por dedicar vuestro tiempo a ayudarme a resolver las dudas técnicas, nunca olvidaré el momento "buffer", gracias por vuestros consejos, risas y cafés en momentos de crisis.

A los compañeros que conocí durante mi estancia en el CIAL, Dr. Luis M. Rodríguez-Alcalá y a Pilar Castro, por vuestro apoyo profesional, gracias a nuestras conversaciones volví a fascinarme con la ciencia como en los inicios del proyecto. Por supuesto quería agradecer al Dr. Javier Fontecha por brindarme la oportunidad de realizar parte de las investigaciones en su laboratorio.

En definitiva a todo el personal del ICTAN, a todos los compañeros de la USTA, Miguel Ángel, Inma, Estela, Beatriz y Gema por la aportación de vuestros conocimientos y a todo el departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad por toda la ayuda y el compañerismo que me han prestado en mi paso por el ICTAN.

Millones de gracias por los buenos consejos, apoyo incondicional, y comprensión que me habéis dado a lo largo de toda esta etapa de mi vida, aun sin entender muy bien qué es lo que estaba haciendo en este mundo paralelo llamado "Ciencia-Investigación", gracias, Tere, Sandri, Sandreta, Carla, Estefanía, Bea, Layla, Visi y Miguel. Gracias Carlota por ayudarme a conectar con la ilusión de seguir aprendiendo en los momentos más decisivos. Quería dar las gracias especialmente a mi prima "Miriam Sugranyes" por dedicar su tiempo y creatividad en ilustrar la portada y contraportada de la

Tesis Doctoral.

A quienes quiero agradecer enormemente esta tesis es a mis padres, GRACIAS, por apoyarme incondicionalmente en todas mis locuras sin verlo ni entenderlo; gracias por inculcarme la pasión por la ciencia, la autodisciplina, los buenos hábitos, la fuerza y la determinación de luchar por hacer realidad mis sueños, mis metas, mis locuras, gracias por acompañarme en esta época de siembra. Gracias por todo lo que me habéis dado a lo largo de mi vida.

A mi hermano, gracias por ayudarme a levantar cada vez que me tropiezo, a animarme a seguir hacia adelante. Gracias por enseñarme a “simplificar y relativizar”, porque como muchas veces me has dicho, la vida es fácil, somos nosotros mismos quienes nos la complicamos.

Finalmente, y aunque parezca surrealista, quería agradecer la existencia de las cebollas y las ratas, porque sin ellas, por mucho apoyo que haya recibido, esta tesis (ni muchas otras) no hubiese sido posible.

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
<hr/>	
RESUMEN	7
SUMMARY	13
<hr/>	
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
1. Cebolla	21
1.1. Composición nutricional de la cebolla	21
1.2. Compuestos bioactivos de la cebolla	21
1.2.1. Compuestos organosulfurados	23
1.2.2. Polifenoles	24
1.2.2.1. Clasificación y estructura	24
1.2.2.1.1. Ácidos fenólicos	26
1.2.2.1.2. Alcoholes fenólicos	26
1.2.2.1.3. Estilbenos	26
1.2.2.1.4. Lignanos	26
1.2.2.1.5. Flavonoides	27
1.2.2.2. Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de la dieta	31
2. Actividad biológica de la cebolla	33
2.1. Actividad antioxidante	35
2.1.1. Estrés oxidativo	35
2.1.2. Métodos para evaluar la actividad antioxidante	37
2.2. Actividad antiinflamatoria	41
2.2.1. Inflamación	41
2.2.2. Estrés oxidativo e inflamación en estados de hipercolesterolemia	42
3. Procesado de alimentos por alta presión hidrostática	47
3.1. Fundamento	47
3.2. Aspectos tecnológicos y equipamiento	48
3.3. Efecto de las altas presiones sobre los alimentos	50
3.3.1. Efecto de las altas presiones sobre nutrientes y compuestos bioactivos	50

3.3.2. Efecto de las altas presiones sobre la actividad antioxidante	54
4. Liofilización	56
4.1. Fundamento	56
4.2. Etapas del proceso de liofilización	57
4.3. Efecto de la liofilización sobre compuestos bioactivos de vegetales	58
5. Alimentos funcionales	60
5.1. Clasificación de los alimentos funcionales	62
5.2. Mercado de los alimentos funcionales	64
6. Actividad biológica de alimentos vegetales funcionales <i>in vivo</i>	66

2. OBJETIVOS	75
---------------------	----

3. MATERIALES Y MÉTODOS	79
--------------------------------	----

3.1. Preparación de las muestras de cebolla	81
3.2. Composición nutricional de la cebolla procesada	83
3.2.1. <i>S</i> -alque(en)il-L-cisteína sulfóxidos	83
3.2.2. Ácidos orgánicos	84
3.2.3. Azúcares	85
3.2.4. Proteínas	85
3.2.5. Cenizas	85
3.2.6. Minerales	85
3.2.7. Ácido ascórbico y vitamina C total	86
3.3. Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de la cebolla	87
3.3.1. GC-MS mediante la técnica de espacio de cabeza	87
3.3.1.1. Identificación	87
3.3.1.2. Cuantificación	87
3.4. Caracterización de compuestos fenólicos	88
3.4.1. Determinación del contenido de fenoles totales	88
3.4.2. Identificación y cuantificación de flavonoles	89
3.5. Determinación de la actividad antiinflamatoria	90
3.5.1. Actividad inhibitoria de la hialuronidasa	90
3.5.2. Captación de radicales libres de óxido nítrico	91
3.6. Determinación de la actividad antioxidante	92

3.6.1. Medida del secuestro del radical ABTS ^{•+}	92
3.6.2. Medida del secuestro del radical DPPH [•]	92
3.6.3. Medida de la capacidad de reducción férrica (FRAP)	93
3.6.4. Medida de la capacidad antioxidante por PCL	94
3.7. Animales y diseño experimental	94
3.8. Recogida de sangre y órganos	97
3.9. Determinación del perfil lipídico y de los parámetros bioquímicos	97
3.10. Determinación de las propiedades bioactivas de la cebolla	97
3.10.1. Bioamarcadores de estrés oxidativo	97
3.10.2. Biomarcadores de inflamación y de riesgo cardiovascular	100
3.10.3. Análisis de ácidos grasos	100
3.10.4. Efecto prebiótico	101
3.11. Análisis estadístico	103
<hr/>	
4. RESULTADOS	105
Artículo 1: Nutritional composition of processed onion: <i>S</i> -alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, organic acids, sugars, minerals, and vitamin C	107
Artículo 2: Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS GC-MS)	119
Artículo 3: Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion	129
Artículo 4: Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats	143
Artículo 5: Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats	153
<hr/>	
5. DISCUSIÓN GENERAL	195
5.1. Caracterización cuali- y cuantitativa de los constituyentes bioactivos de cebolla procesada por alta presión hidrostática y liofilizada	197
5.1.1. Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de ACSOs, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C	199

5.1.2.Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de compuestos volátiles	202
5.1.3.Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de flavonoles	208
5.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> de extractos de cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización	210
5.3. Evaluación de los efectos de la cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización como ingrediente funcional en la actividad antiinflamatoria, antioxidante e hipocolesterolémica, los biomarcadores de riesgo cardiovascular y el perfil de ácidos grasos en ratas Wistar hipercolesterolémicas	215
<hr/>	
6. CONCLUSIONES	229
<hr/>	
7. BIBLIOGRAFÍA	235

Abreviaturas

123-DRH:	Test dehidro-rodamina 123
¹O₂:	Oxígeno singlete
AAPH:	2,2'-azobis(2-amidinopropano)diclorhidrato
ABTS:	Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACAT:	Acil-coA-colesterol-aciltransferasa
ACL:	Capacidad antioxidante en sustancias hidrosolubles (<i>"Antioxidative capacity in water-soluble substances"</i>)
ACL:	Capacidad antioxidante en sustancias hidrosolubles (<i>"Antioxidative capacity in lipid soluble substances"</i>)
ACSOs:	S-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxido
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AND:	Academia de Nutrición y Dietética (<i>"Academy of Nutrition and Dietetics"</i>)
AI:	Índice aterogénico (<i>"Atherogenic Index"</i>)
ALT/GPT:	Alanina aminotransferasa
Ang I:	Angiotensina I
Ang II:	Angiotensina II
ANOVA:	Análisis de varianza
APH:	Alta presión hidrostática
API:	Ionización a presión atmosférica (<i>"Atmospheric-pressure ionization"</i>)
AST/GPT:	Aspartato aminotransferasa
ATP:	Adenosina trifosfato
BCSO:	S-Butil-L-cisteína sulfóxido
C:	Dieta Control
C18:	Ácido esteárico
C18:1 c9:	Ácido oleico
C18:2 c9c12:	Ácido linoleico
C20:4n6:	Ácido araquidónico (AA)
C22:6n3:	Ácido docosahexanoico (DHA)
Ca:	Calcio
CAM:	Moléculas de adhesión celular (<i>"Cell Adhesion Molecules"</i>)
CAT:	Catalasa
Cebacat:	Asociación Catalana de Productores-Comercializadores de Cebolla
CL:	Cebolla liofilizada
C-LDL:	Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
CP:	Cebolla pulverizada
CT:	Cebolla troceada
CTAB:	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DMPD:	N,N-dimetil-p-fenilendiamina
DMPO:	N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina

DNP:	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH:	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
DTT:	Ditiotreitol
ECA:	Enzima convertidora de la angiotensina
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
eNO:	Enzima nitrato sintasa endotelial
ESI:	Ionización por electrospray (<i>“Electrospray Ionization”</i>)
ESR:	Resonancia del espín electrónico (<i>“Electron Spin Resonance”</i>)
FAMES:	Ésteres metílicos de ácidos grasos (<i>“Fatty acids methyl esters”</i>)
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (<i>“Food and Agriculture Organization”</i>)
FCL/Photochem:	fotoquimioluminiscencia
Fe:	Hierro
FOSHU:	Alimentos para el uso específico en la salud (<i>“Foods for specified health uses”</i>)
FRAP:	Capacidad de reducción férrica (<i>“Ferric Reducing Antioxidant Power”</i>)
FUFOSE:	Comisión Europea sobre la Ciencia de los Alimentos Funcionales (<i>“The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe”</i>)
HS GC-MS:	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (<i>Headspace gas chromatography-mass spectrometry</i>)
GGT:	Gamma glutamil transpeptidasa
GPx:	Glutación peroxidasa
GR:	Glutación reductasa
GSSG:	Glutación oxidado
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄:	Ácido sulfúrico
HC:	Dieta rica en colesterol
HCl:	Ácido clorhídrico
HCl₄:	Ácido tetraoxoclórico
HCO:	Dieta rica en colesterol enriquecida con cebolla
HDL:	Lipoproteína de alta densidad (<i>“High density lipoprotein”</i>)
HDL-C:	Colesterol HDL
HNE:	Hidroxinonenal
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>“High performance liquid chromatography”</i>)
HPLC-MS:	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (<i>“High performance liquid chromatography- mass spectrometry”</i>)
I3,4G:	Isorhamnetina 3,4'-diglucósido
I4G:	Isorhamnetina 4'-glucósido
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular-1 (<i>“Intercellular adhesion molecule 1”</i>)
IFN-γ:	Interferón-γ
IFT:	<i>“Institute of Food Technologists”</i>

IL-1:	Interleuquina-1
IL-10:	Interleuquina-10
IL-1β:	Interleuquina-1 β
IL-1α:	Interleuquina-1 α
IL-6:	Interleuquina-6
ILSI:	Instituto Internacional de Ciencias de la vida (“ <i>International Life Sciences Institute</i> ”)
INF-γ:	Interferón gamma
iNOs:	Enzima nitrato sintasa inducible (“ <i>Inducible nitric oxide synthase</i> ”)
K:	Potasio
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad (“ <i>Low density lipoprotein</i> ”)
LDL-C:	Colesterol LDL
LDLox:	Lipoproteína de baja densidad oxidada (“ <i>Oxidized low density lipoprotein</i> ”)
LPS:	Lipopolisacárido
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (“ <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> ”)
MDA:	Malondialdehído
Mg:	Magnesio
mmHg:	Milímetros de mercurio
MMPs:	Metaloproteinasas de la matriz extracelular (“ <i>Matrix metalloproteinases</i> ”)
Mn:	Manganeso
MPa:	Megapascal
MUFA:	Ácidos grasos monoinsaturados (“ <i>Monounsaturated fatty acids</i> ”)
Na:	Sodio
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (“ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ”)
NaOH:	Hidróxido de sodio
NED:	Dihidrocloreuro de N-1-naftilendiamina
NIST:	“ <i>National Insitute Standard and Technology</i> ”
nNOs:	Enzima nitrato sintasa neuronal (“ <i>Neuronal nitric oxide synthase</i> ”)
NO$^{\circ}$:	Anión nitroxilo
NO$^{\circ}$:	Óxido nítrico
NO$_2^{\circ}$:	Dióxido de nitrógeno
NOs:	Óxido nítrico sintasa
O$_2^{\circ}$:	Anión superóxido
OH$^{\circ}$:	Radical hidroxilo
ONOO$^{\circ}$:	Peroxinitrito
ORAC:	Capacidad de captación de radicales oxigenados (“ <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> ”)
P:	Fósforo
Pa:	Pascal
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (“ <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> ”)
PASSCLAIM:	Process of the Assessment of Scientifici Support for Claims on Foods

PCL:	Capacidad antioxidante por fotoquimioluminiscencia (“ <i>Photochemiluminescence assay</i> ”)
Pf:	Peso fresco
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados (“ <i>Polyunsaturated fatty acids</i> ”)
Q3,4G:	Quercetina 3’4’-diglucósido
Q3,7,4G:	Quercetina 3,7,4’-triglucósido
Q3G:	Quercetina 3-glucósido
Q4G:	Quercetina 4’-diglucósido
Q7,4G:	Quercetina 7,4’-diglucósido
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno (“ <i>Reactive nitrogen species</i> ”)
ROO[•]:	Radical peroxilo
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (“ <i>Reactive oxygen species</i> ”)
SCAN:	Barrido completo
Se:	Selenio
SFA:	Ácidos grasos saturados (“ <i>Saturated fatty acid</i> ”)
s-ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular-1 (“ <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> ”)
SIM:	Monitorización del ión seleccionado (“ <i>Selected ion monitoring</i> ”)
SNP:	Nitroprusiato sódico
SOD:	Superóxido dismutasa
T0:	Cebolla sin tratar con altas presiones
T1:	Cebolla tratada con altas presiones a 200 MPa/25° C/5 min
T2:	Cebolla tratada con altas presiones a 400 MPa/25° C/5 min
T3:	Cebolla tratada con altas presiones a 600 MPa/25° C/5 min
TC:	Colesterol total (“ <i>Total cholesterol</i> ”)
TEAC:	Capacidad antioxidante equivalente a trolox (“ <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> ”)
TIMP-1:	Inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (“ <i>Metalloproteinase inhibitor -1</i> ”)
TiMPs:	Inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (“ <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> ”)
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral- α (“ <i>Tumor necrosis factor</i> ”)
TOSC:	Capacidad secuestradora de radicales de oxígeno totales (“ <i>Total Oxyradical Scavenging Capacity</i> ”)
TPTZ:	2,4,6-tripiridil-S-triazina
TRAP:	Potencial de captación total de radicales (“ <i>Total Radical-trapping Antioxidant parameter</i> ”)
UFC:	Unidades formadoras de colonias
USDA:	United States Department of Agriculture
VCAM-1:	Molécula de adhesión vascular-celular-1 (“ <i>Vascular cell adhesion protein 1</i> ”)
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular (“ <i>Vascular endothelial growth factor</i> ”)
vWF:	Factor von Willebrand (“ <i>Von Willebrand factor</i> ”)
Zn:	Zinc

Resumen

Título: Evaluación de las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de cebolla procesada como ingrediente funcional *in vitro* y en un modelo animal

Introducción:

Los avances científicos han evidenciado el papel fundamental de la dieta en la salud, existiendo un creciente interés del consumidor en la relación entre la dieta y la salud. Estudios epidemiológicos realizados durante las últimas décadas demuestran la conexión que existe entre el tipo de alimento consumido y su composición, con la mejora o el mantenimiento de un estado saludable del individuo. Los alimentos funcionales presentan efectos específicos beneficiosos para la salud humana más allá de la nutrición básica. En este sentido, se están descubriendo propiedades funcionales en muchos alimentos de origen vegetal, dentro de los cuales se encuentra la cebolla, con potencial como alimento funcional.

La composición nutricional de la cebolla es muy compleja, presenta diversos fructooligosacáridos como carbohidratos de reserva, y se caracteriza por presentar cantidades significativas de vitaminas, minerales y elementos traza. La cebolla es rica en compuestos bioactivos, entre los que cabe destacar los compuestos organosulfurados, como los *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos y los flavonoides como la quercetina, a los cuales se les atribuye los potenciales efectos beneficiosos para la salud. Existen numerosos estudios sobre la potencial actividad biológica de la cebolla, especialmente propiedades anticancerígenas, efectos en el metabolismo lipídico, efectos cardioprotectores, actividad antibiótica y propiedades antioxidantes.

La creciente demanda por parte del consumidor de alimentos fáciles de consumir, seguros y con propiedades biológicas más allá de las nutricionales, manteniendo su calidad sensorial y organoléptica, ha motivado a investigadores e industriales al desarrollo de nuevas tecnologías de procesado, siendo las altas presiones hidrostáticas una de las que ha recibido mayor atención. El potencial y las limitaciones del procesado de alimentos mediante altas presiones hidrostáticas ha sido extensamente estudiado, la gran mayoría de investigaciones se han centrado en estudiar su aplicación como método de inactivación microbiana y enzimática. Sin embargo, son escasos los estudios realizados sobre el efecto que ejerce el procesado de alimentos por alta presión hidrostática sobre la potencial actividad biológica de los mismos.

Objetivo:

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto de las altas presiones hidrostáticas (APH) y la liofilización sobre los compuestos bioactivos responsables de la actividad biológica de la cebolla, así como, poner de manifiesto las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de la cebolla como ingrediente funcional en la prevención cardiovascular a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, en un modelo animal de hipercolesterolemia inducida por la dieta.

Resultados:

Inicialmente, con el fin de evaluar los efectos que los diferentes tratamientos de altas presiones, en combinación con un proceso de liofilización, en la composición nutricional de la cebolla –en términos del contenido de compuestos organosulfurados, flavonoles, ACSOs, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C–, se realizó la caracterización cuali- y cuantitativa de los compuestos bioactivos de la cebolla en muestras troceadas y en muestras liofilizadas-pulverizadas. De esta forma, se estableció que la combinación del tratamiento con altas presiones y el proceso de la liofilización- pulverización, produjo una disminución en el contenido de ACSOs y la concentración total de compuestos volátiles, mantuvo las concentraciones de la mayoría de ácidos orgánicos, azúcares totales, proteína total y minerales, e incrementó el contenido de ácido ascórbico y vitamina C. Además, favoreció la extractabilidad de algunos compuestos organosulfurados –dipropil disulfuro, propionaldehído y del dimetil trisulfuro–, así como de los flavonoles: quercetina 3,4'-diglucósido, quercetina 4'-glucósido, quercetina 3'-glucósido e isorhamnetina 3,4'-diglucósido.

Por otra parte, dado que la inflamación y la oxidación juegan un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis, se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de la cebolla tratada con altas presiones y de la cebolla tratada con altas presiones combinada con un proceso de liofilización y pulverización. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, apuntan a una mejora en la actividad antiinflamatoria de la cebolla procesada con altas presiones y liofilizada, destacando una mayor capacidad de captación de radicales libres de NO^{*}, una mejora del secuestro del radical ABTS^{•+} y del DPPH^{*}, y de la capacidad de reducción férrica, en comparación con las muestras no presurizadas. En

general, los resultados de la actividad antioxidante determinada con diferentes métodos, por sus diferencias en mecanismos de reacción, oxidación y en especies reactivas, mostraron un incremento en la actividad antioxidante, así como una correlación estadísticamente significativa entre el contenido de los glucósidos de flavonoles y los valores de actividad antioxidante.

Por consiguiente, se concluyó que el tratamiento que más favoreció la extracción de compuestos bioactivos de cebolla, así como también dio lugar a una mayor actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* fue el tratamiento de alta presión hidrostática a 400 MPa/25° C/5 min en combinación con un proceso de liofilización y pulverización (CPT2).

Tras los resultados obtenidos *in vitro*, el siguiente paso de la investigación era conocer los efectos *in vivo* de este tipo de compuestos, para ello se procedió a la preparación del ingrediente de cebolla tratado por APH para realizar un estudio *in vivo* en un modelo de ratas Wistar con hipercolesterolemia inducida a través de la dieta (2 % colesterol) y evaluar sus potenciales propiedades beneficiosas para la salud. Entre ellas, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas, biomarcadores de riesgo cardiovascular, composición de ácidos grasos y efecto prebiótico. Al inducirse el estado de hipercolesterolemia en los roedores, se activa la producción de radicales libres dando lugar a un estado de estrés oxidativo. En las ratas Wistar alimentadas durante 7 semanas con una dieta hipercolesterolémica a las que se les suministró el ingrediente cebolla (HCO) se observó un efecto frente al estrés oxidativo potenciando la actividad de enzimas SOD, CAT y GPx en eritrocitos y en hígado. Así mismo, también se observó una disminución de los valores de las enzimas hepáticas –ALT/GPT y AST/GOT–, de las proteínas carboniladas y de biomarcadores de inflamación y riesgo cardiovascular, tales como IL-10, MCP-1, VEGF, s-ICAM-1, sE-selectina, PAI-1, v-WF y TIMP-1.

Cabe destacar también, que el enriquecimiento de la dieta con el ingrediente de cebolla, dio lugar a modificaciones beneficiosas en la microbiota de las ratas, produciendo un incremento en *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. durante la primera semana y una disminución de *Clostridium* spp. tras siete semanas de alimentación con las diferentes dietas.

Además de los efectos de la dieta rica en colesterol citados anteriormente, se debe tener en consideración que también puede verse modificado el metabolismo de los ácidos grasos y la composición lipídica de la membrana plasmática, viéndose afectada y alterada la

función normal de las diferentes proteínas de membrana y su respectiva función. En este sentido, se observó que la dieta rica en colesterol modificó la composición de los ácidos grasos individuales, siendo en algunos casos potenciada por el ingrediente cebolla, pudiendo ser debido al efecto ejercido por el ingrediente en la actividad de las enzimas Δ -5 y Δ -6 desaturasas.

Conclusiones:

La evaluación de los efectos del tratamiento con altas presiones en combinación con un proceso de liofilización sobre los compuestos bioactivos de la cebolla y sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e hipolipídicas *in vitro* e *in vivo*, llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral, han puesto de manifiesto las propiedades funcionales de la cebolla, fuente importante de polifenoles y compuestos organosulfurados, que puede contribuir a mejorar el perfil lipídico y a revertir el efecto de algunos biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo animal de hipercolesterolemia inducida por la dieta.

Summary

Title: Evaluation of antiinflammatory, antioxidant, and hypolipidemic properties of processed onion as a functional ingredient by means of *in vitro* and in an animal model

Introduction:

The scientific advances have evidenced the fundamental role of the diet in health, showing an increased attention of consumers towards the close association between food and health. In recent decades, epidemiological studies demonstrate the relation between the type of food consumed and its composition with the maintenance or promotion of the general state of health of the individuals. Functional foods have specific beneficial effects on human health beyond basic nutrition. In this sense, functional properties in many traditional foods are being discovered in many foods of plant origin, such as the onion, with potential as a functional food.

The nutritional composition of onion is very complex, is a good source of fructooligosaccharides, and also has significant amounts of vitamins, minerals, and trace elements. Onion is a rich source of bioactive compounds like organosulfur compounds, such as *S*-alqu(en)yl-L-cysteine sulfoxides, and flavonols as quercetin, whose properties have shown to have significant benefits on human health. A large number of studies have shown the potential bioactivity of onion, especially its anticancer and antioxidant properties, lipid metabolism and cardioprotective effects and antibiotic activity.

Researchers and food manufacturers have been motivated to develop new processing technologies, as high hydrostatic pressure, to cover the growing consumer demand for food that is safe, very easy to consume, with an extra added value to its potential biological activity beyond nutritional properties, which maintain their sensorial and organoleptic quality. The potential and limitations of food processing through high hydrostatic pressure have been widely studied. The majority of studies have focused on microbial and enzymatic inactivation. However, there are few studies on the effect of food processing by high hydrostatic pressure on its potential biological activity.

Objective:

The main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the antiinflammatory, antioxidant and hypolipidemic properties of high-pressure (HP)

processed onion as a functional ingredient in cardiovascular disease prevention through *in vitro* and *in vivo* studies in a model of diet induced hypercholesterolemia.

Results:

First of all, to evaluate the effects of different high-pressure treatments combined with freeze-drying and pulverization, focusing on onion nutritional attributes in terms of organosulfur compounds, flavonols, ACSOs, organic acids, sugar, minerals and vitamin C contents, a qualitative and quantitative characterization of onion bioactive compounds was performed in diced onion and freeze-dried-pulverized onion. In general, the combination of high-pressure treatment combined with freeze-drying and pulverization produced a decrease in ACSOs content and on the total concentration of volatile compounds, maintained the concentration of most organic acids, total sugars, total protein and minerals, and increased the content of ascorbic acid and vitamin C. In addition, the combination of the different treatments increased organosulfur compounds –dipropyl disulfide, propionaldehyde, and dimethyl trisulfide– as well as flavonols –quercetin 3,4'-diglucoside, quercetin 4'-glucoside, quercetin 3'-glucoside and isorhamnetin 3,4'-diglucoside– extractability.

Inflammation and oxidation play a major role in the pathogenesis of atherosclerosis disease. In this context, *in vitro* antioxidant and antiinflammatory activity of onion treated with high-pressure and onion treated with high-pressure combined with freeze-dried and pulverization were carried out. Results obtained in this Doctoral Thesis point out to an improvement in the antiinflammatory activity in high-pressure and freeze-dried processed onion, emphasizing a greater NO[•] scavenging capacity, an improvement in the ABTS^{•+} and DPPH[•] scavenging activity, as well as in ferric reducing antioxidant power, compared to non-pressurized onion. In general, the results of antioxidant activity determined by different methods, due to their differences in reaction mechanisms, oxidation, and reactive species, showed an increase in antioxidant activity, as well as statistical correlations among the flavonol glycosides contents and antioxidant activity values.

Therefore, it was concluded that high-pressure treatment at 400 MPa/25° C/5 min combined with freeze-dried and pulverization (CPT2) was the treatment that most favored the extraction of onion bioactive compounds, as well as presented a greater *in vitro* antiinflammatory and antioxidant activity.

The preparation of the onion ingredient treated by HP was then carried out to

perform an *in vivo* study in a Wistar rat model of diet-induced hypercholesterolemia (2 % cholesterol) and to evaluate the effects of onion as a functional ingredient on antiinflammatory, antioxidant and hypolipidemic properties, cardiovascular risk biomarkers, fatty acid composition and prebiotic effect. By inducing the hypercholesterolemia in rodents, the production of free radicals is activated causing oxidative stress. Consumption of a high-cholesterol enriched with onion (HCO) diet for seven weeks demonstrated to act against oxidative stress. In this sense, rats fed the high-cholesterol (HC) diet significantly decreased erythrocyte SOD, CAT and GPx activities compared with the control (C) group. Interestingly, the HCO group showed a significant increase in SOD, CAT and GPx activities compared with the HC group. The HCO group had lower plasma ALT/GPT and AST/GOT than the HC group, thus maintaining similar levels to the C group. Plasma inflammatory parameters, namely IL-10, MCP-1, VEGF, s-ICAM-1, sE-selectin, PAI-1, v-WF, and TIMP-1 were significantly increased in the HC group and onion enrichment modulated this increment.

Furthermore, beneficial modification in gut microflora may occur by including the onion ingredient in the diet. Initial phases of the onion supplementation evidenced increases in *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., whereas decreases in the pathogenic *Clostridium* spp. were also found in the HCO group compared with the HC group after seven weeks of feeding.

In addition to the effects of the cholesterol-rich diet mentioned above, it must be taken into account that the metabolism of fatty acids and the lipid composition of the plasma membrane can also be altered, together with the usual function of the different proteins of the membrane and their respective function. In this context, noticeable effects on individual fatty acid composition were observed when assaying high cholesterol diets in rats, in some cases enhanced by onion enrichment, may be due to the effect exerted by the ingredient on the activity of the Δ -5 and Δ -6 desaturase enzymes.

Conclusions:

The evaluation of the effects of high-pressure treatment in combination with freeze-dried process on onion bioactive compounds and their antioxidant, antiinflammatory and hypolipidemic properties by means of *in vivo* and *in vitro* studies have revealed the functional properties of onion. An important source of flavonols and organosulfur

compounds, which may contribute to the improvement of the lipid profile and to reverse the effect on some oxidative stress and inflammation biomarkers using an animal model of diet-induced hypercholesterolemia.

1. Revisión

Bibliográfica

1. Cebolla

La cebolla es una planta herbácea bianual perteneciente a la familia de las liliáceas. Es una especie del género *Allium* (*Allium cepa* L.), originaria de Asia Central, planta que ha sido cultivada durante más de 4.000 años y es apreciada mundialmente por sus características organolépticas y nutricionales. La cebolla se consume de formas muy diversas, siendo las más comunes: cruda, madura, en escabeche, en polvo, hervida, en guisos, fritas y en vinagre.

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la cebolla se cultiva en más de 175 países diferentes. La producción mundial de cebolla en el año 2014 fue de 88,4 millones de toneladas, siendo en España de 1.364.333 mil toneladas (FAO, 2014).

1.1. Composición nutricional de la cebolla

Las cebollas son muy apreciadas por su sabor y por su valor nutricional principalmente macronutrientes como hidratos de carbono (estructurales y no estructurales), siendo una importante fuente de fibra, fructooligosacáridos (Jaime *et al.*, 2002) y de ácidos orgánicos (Rodríguez-Galdón *et al.*, 2008). Las cebollas también presentan cantidades significativas de vitaminas (como la vitamina C), minerales y elementos traza (Griffiths *et al.*, 2002). En la **Tabla 1** se muestra la composición nutricional de la cebolla cruda.

1.2. Compuestos bioactivos de la cebolla

Las cebollas son una de las principales fuentes alimenticias de compuestos bioactivos, entre los que cabe destacar los flavonoides, los compuestos organosulfurados (como *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos, ACSOs) y sus productos de degradación (tiosulfinatos, tiosulfonatos, y compuestos mono y trisulfuros), los fructooligosacáridos y la fibra dietética (Lanzotti 2006; Griffiths *et al.*, 2002; Benítez *et al.*, 2011).

Su bioactividad ha sido demostrada a través de múltiples mecanismos, como la actividad antioxidante (Lu *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2007; Shim *et al.*, 2011) antiinflamatoria (Mohammadi-Motlagh *et al.*, 2011; Dorsch *et al.*, 1990) y antibacteriana

Tabla 1. Composición nutricional de la cebolla

Nutriente	Unidad	Valor
Agua	g	89,11
Energía	kcal	40
Proteína	g	1,10
Lípidos	g	0,10
Ácidos grasos saturados	g	0,042
Ácidos grasos monoinsaturados	g	0,013
Ácidos grasos poliinsaturados	g	0,017
Hidratos de carbono	g	9,34
Fibra total	g	1,7
Azúcares totales	g	4,24
Ca	mg	23
Fe	mg	0,21
Mg	mg	10
P	mg	29
K	mg	146
Na	mg	4
Zn	mg	0,17
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	7,4
Tiamina	mg	0,046
Riboflavina	mg	0,027
Niacina	mg	0,116
Vitamina B ₆	mg	0,120
Ácido fólico	µg	19
Vitamina A	IU	2
Vitamina E	mg	0,02
Vitamina K	µg	0,4

Valores nutricionales por 100 g de porción comestible. USDA 2016

(Kyund, 2012). Muchos de estos mecanismos han sido comprobados *in vitro* e *in vivo*, y se evidencian sus efectos beneficiosos para la salud humana destacando la prevención del desarrollo de patologías relacionadas con las enfermedades cardiovasculares (Wilson *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Nakayama *et al.*, 2013; Roldán-Marín *et al.*, 2009, 2009b, 2010).

1.2.1. Compuestos organosulfurados

La fracción volátil de la cebolla está constituida mayoritariamente por compuestos azufrados (dimetil trisulfuro, propenil propil disulfuro, metil propil trisulfuro y dipropil trisulfuro) a los que se les atribuye un efecto protector frente a determinados tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Asimismo, se ha demostrado que pueden contribuir a disminuir niveles de colesterol, estimular el sistema inmunitario y presentar una actividad antibacteriana (Griffiths *et al.*, 2002). Los compuestos azufrados volátiles característicos de la cebolla no están presentes como tales en las células intactas. Estos compuestos volátiles se originan por diversas vías bioquímicas a partir de precursores, como por ejemplo, piruvato, amoníaco, ácidos sulfónicos y diversos tiosulfinatos como la alicina (tiosulfinato de dialilo). Dichos tiosulfinatos se forman por la hidrólisis enzimática catalizada por la enzima aliinasa de los *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxido (ACSOs) como la aliina que se encuentran de forma natural en las células de la cebolla, e iniciada al producirse la disrupción del tejido celular, al cortar o procesar la cebolla. Además, los tiosulfinatos se transforman a través de otras vías de degradación no enzimáticas en compuestos azufrados como cepaenos, mono-, di-, tri-, tetrasulfuros, tioles, tiofenos y dióxido de azufre (Griffiths *et al.*, 2002; Corzo-Martínez *et al.*, 2007). La síntesis de estos compuestos sulfurados y su concentración está influenciada por las características genéticas de la planta y las condiciones en las que crece y se desarrolla (Griffiths *et al.*, 2002). Los compuestos mayoritarios de la fracción volátil de la cebolla —dimetil trisulfuro, propenil propil disulfuro, metil propil trisulfuro y dipropil trisulfuro— son, en parte, responsables de su bioactividad (Islam *et al.*, 2008).

Algunos estudios indican que los compuestos sulfurados presentes en la cebolla ejercen un efecto protector en el inicio de la carcinogénesis (Powolny y Singh, 2008). De hecho, se ha demostrado que los compuestos organosulfurados ejercen múltiples efectos biológicos, tales como: inducción de la detoxificación de carcinógenos, inhibición de la proliferación de células tumorales, efecto antimicrobiano, secuestro de radicales libres,

inhibición de aductos de ADN, inducción de la detención del ciclo celular e inducción de apoptosis. Con todo ello, se sugiere que dichos compuestos actúan como agentes quimiopreventivos a través de la combinación de diferentes mecanismos (Moriarty *et al.*, 2007).

Además, se ha propuesto que el efecto quimioprotector de los sulfuros de cebolla se debe, al menos en parte, a la capacidad de estos sulfuros de aumentar las actividades de las enzimas detoxificantes de fase II (Guyonnet, 2001; Teyssier *et al.*, 2001).

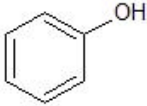
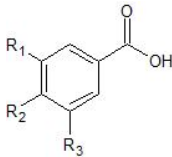
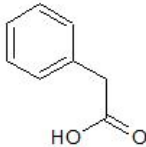
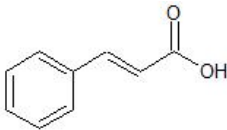
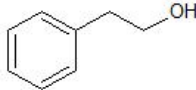
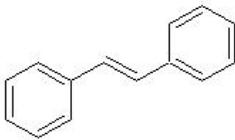
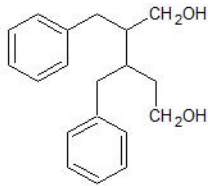
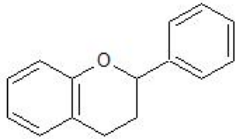
1.2.2. Polifenoles

Los polifenoles son el mayor grupo de fitoquímicos distribuidos en el reino vegetal. Son muy abundantes en alimentos de la dieta (como las verduras, las frutas, las legumbres, el chocolate o el aceite de oliva) y en las bebidas (como el vino, el té o el café) (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2010). Los estudios epidemiológicos realizados en los últimos años apuntan que una dieta rica en compuestos fenólicos está relacionada con efectos positivos en la salud, y destacan el papel en la prevención de varias enfermedades asociadas a estrés oxidativo, como enfermedad cardiovascular, cáncer o enfermedad neurodegenerativa (Scalbert *et al.*, 2005; Visoli *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2009; Vauzour *et al.*, 2010; Trachootham *et al.*, 2008; Vauzour *et al.*, 2007). Recientemente, se ha despertado un gran interés científico sobre el papel de los compuestos fenólicos y los efectos beneficiosos que pueden producir en la salud, así como por conocer cuáles de estos compuestos están presentes y en qué proporción. Del mismo modo, cada vez está más en auge el interés a nivel científico por evaluar los cambios producidos en el contenido fenólico del alimento al ser sometido a diferentes tratamientos.

1.2.2.1. Clasificación y estructura

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más amplios del reino vegetal, incluyen desde compuestos con un solo anillo fenólico en su estructura hasta compuestos altamente polimerizados. Existen más de ocho mil compuestos fenólicos diferentes distribuidos en las plantas, clasificados en varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Atendiendo a su estructura química, los polifenoles o compuestos fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides (**Tabla 2**) (D'Archivio *et al.*, 2007).

Tabla 2. Estructura básica de compuestos fenólicos

<i>Clase</i>	<i>Subclase</i>	<i>Esqueleto</i>	<i>Estructura básica</i>
Fenoles simples		C ₆	
Ácidos fenólicos	Ácido hidroxibenzoico	C ₆ -C ₁	
	Ácido fenilacético	C ₆ -C ₂	
	Ácido hidroxicinámico	C ₆ -C ₃	
Alcohol fenólico		C ₆ -C ₂	
Estilbeno		C ₆ -C ₂ -C ₆	
Lignano		C ₆ -C ₃	
Flavonoide		C ₆ -C ₃ -C ₆	

1.2.2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos poseen en su estructura un solo anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Atendiendo a su estructura, se dividen en dos subclases: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico, y se diferencian entre ellos por el número de átomos de carbono de los sustituyentes.

Los ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1) están presentes en pocos alimentos de origen vegetal y, además, en concentraciones bajas (excepto en rábanos, cebollas, vino y ciertos frutos rojos, y en bebidas como el té). Los principales representantes son los ácidos gálico, síringico, protocatéquico y vanílico (D'Archivio *et al.*, 2007).

Los ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3) son compuestos fenólicos de bajo peso molecular; los principales son los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico. Dichos ácidos suelen encontrarse como derivados glicosilados, pero también esterificados con ácido quínico, ácido siquímico o ácido tartárico. El ácido clorogénico que es una combinación de los ácidos cafeico y quínico, se encuentra con frecuencia en muchos tipos de frutas y en el café (Crozier *et al.*, 2012).

1.2.2.1.2. Alcoholes fenólicos

Los principales alcoholes fenólicos son el tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4 dihidroxifeniletanol), formados ambos por un anillo fenólico unido a un sustituyente que es un grupo etanol (C_6-C_2). El aceite de oliva es una de las fuentes principales de alcoholes fenólicos, aunque también se encuentra en bebidas como el vino (Piñeiro *et al.*, 2011; Cabrini *et al.*, 2001).

1.2.2.1.3. Estilbenos

Los estilbenos están constituidos por dos anillos fenilos conectados por un puente de metileno de dos carbonos ($C_6-C_2-C_6$) (Pandey *et al.*, 2009). Los estilbenos son poco abundantes en la dieta humana. El principal representante es el resveratrol; es abundante en la piel de uva tinta, lo que contribuye a su alta concentración en el zumo de uva y en el vino tinto.

1.2.2.1.4. Lignanós

Los lignanos son producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano ($C_6-C_3-C_3-C_6$). Los principales lignanos son enterodiol y pinoresinol. La

principal fuente son las semillas de lino, las semillas de calabaza, las semillas de ajonjolí, el centeno, la soja, el brócoli y algunas bayas, aunque su concentración es muy baja, del orden de $\mu\text{g/g}$ de producto seco (Crosby, 2005).

1.2.2.1.5. Flavonoides

Los flavonoides son el grupo mayoritario dentro de los polifenoles. Actualmente, se han descrito unos cinco mil flavonoides en frutas y verduras (Harborne, 1993), así como en sus derivados (cerveza, zumo o vino, entre otros). En los años noventa hubo un gran interés por el estudio de los flavonoides y su relación con la salud, gracias a la publicación de diversos estudios epidemiológicos que asociaban una menor incidencia de cáncer y de enfermedades cardiovasculares con una mayor ingesta de flavonoides (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1996; Keli *et al.*, 1996; Geleijnse *et al.*, 2002).

Los flavonoides se caracterizan por su estructura de difenilpropano ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (**Figura 1**). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos y son, por lo tanto, estructuras polifenólicas. Los flavonoides se encuentran principalmente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (llamados agliconas). Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como *O*-glucósidos, con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno, o como *C*-glucósidos, con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono; la forma natural más abundante es la *O*-glucósido.

Los flavonoides se clasifican en seis subclases en función del estado de oxidación del heterociclo y del número y de la posición de los sustituyentes hidroxilo (Manach *et al.*, 2004). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antiocianidinas y flavanoles. A su vez, se dividen en subclases dependiendo de los sustituyentes en el anillo B y la sustitución en los diferentes hidroxilos de la molécula.

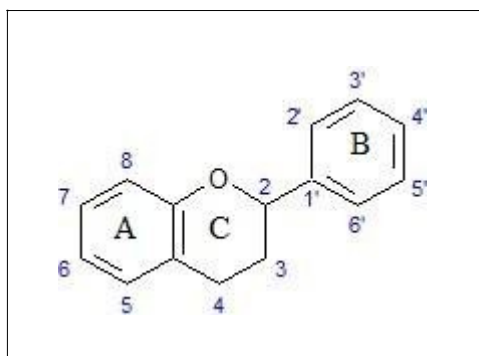


Figura 1. Estructura básica de un flavonoide

Flavonoles

Se caracterizan por una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃ del anillo C y se diferencian entre ellos por los sustituyentes del anillo B (**Figura 2**). Se encuentran en la naturaleza glicosilados o acilados en la posición 3 del anillo C, principalmente, pero también pueden aparecer en la posición 5, 7, 4', 3' y 5'. Los flavonoles más representativos son la quercetina, el kaempferol y la miricetina, pero la quercetina es el más abundante. La principal fuente dietética de quercetina es la cebolla, aunque también está presente en la col, el brócoli, las espinacas, las uvas y en productos derivados de la uva. Los principales flavonoles en la cebolla son la quercetina-4'-O-glucósido y la quercetina-3,4'-O-glucósido, y también, aunque en menor cantidad, la isorhamnetina-4'-O-glucósido (Mullen *et al.*, 2004).

Flavonoles			
Estructura Básica	Miricetina	Quercetina	Kaempferol

Figura 2. Estructura básica de los principales flavonoles

Flavonas

Las flavonas presentan una estructura muy similar a los flavonoles. Poseen una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃ del anillo C, con la diferencia de que carecen del grupo hidroxilo en posición 3 de ese anillo (**Figura 3**). La mayoría están glicosiladas en la posición 7. La apigenina y la luteolina son las flavonas más abundantes en la dieta. Las flavonas son mucho menos comunes en frutas y vegetales que los flavonoles. Las fuentes

más importantes dentro de los alimentos son el apio, el perejil y la alcachofa (Crozier *et al.*, 2006). Además, importantes cantidades de flavonas polimetoxiladas se encuentran exclusivamente en la piel de los cítricos (Crozier *et al.*, 2006b).

Flavonas		
Estructura Básica	Luteolina	Apigenina

Figura 3. Estructura básica de las principales flavonas

Flavanonas

Las flavanonas son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se caracterizan a nivel estructural por la ausencia de un doble enlace 2,3 y por la presencia de un centro quiral en el C₂ (Iwashina, 2000) (**Figura 4**). Los alimentos más ricos en este grupo de flavonoides son los cítricos, aunque también están presentes en el tomate y en algunas plantas aromáticas. Las flavanonas más importantes son la naringenina y la hesperetina, aunque frecuentemente se encuentran glicosiladas como naringina y hesperidina, respectivamente.

Flavanonas			
Estructura Básica	Naringenina	Hesperetina	Eriodictol

Figura 4. Estructura básica de las principales flavanonas

Flavanoles

Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C₃. En la naturaleza pueden aparecer como monómeros (catequinas) o como polímeros con distintos grados de polimerización, como son los oligómeros (procianidinas) o los polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Además, se caracterizan por ser los únicos flavonoides que no aparecen de forma glicosilada en los alimentos (D'Archivio *et al.*, 2007).

Los flavanoles más representativos del grupo son la catequina y la epicatequina (**Figura 5**). La catequina se encuentra principalmente en el vino tinto, frutas como el albaricoque y el chocolate, aunque el té presenta el mayor contenido (Manach *et al.*, 2004; Lakenbrink *et al.*, 2000). Los flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina, galoncatequín-galato, epigalocatequina y epigalocatequín-galato) son monómeros presentes en fruta y té verde, mientras que los flavan-3,4-dioles predominan en leguminosas, uva y vino (Hollman y Arts, 2000). Estos compuestos son los responsables de la astringencia de ciertas frutas (uvas, melocotones, caquis y bayas) y bebidas (vino, té, cerveza), así como del amargor del cacao (Scalbert *et al.*, 2005).

Flavanoles		
Estructura Básica	Catequina	Galocatequina

Figura 5. Estructura básica de los principales flavanoles

Isoflavonas

Las isoflavonas poseen un anillo bencénico lateral en posición C3 y su estructura es similar a la de los estrógenos (**Figura 6**). Los principales representantes son genisteína, daidzeína y gliciteína. Se encuentran sobre todo en las legumbres, y su principal fuente son la soja y sus derivados.

Isoflavonas			
Estructura Básica	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína

Figura 6. Estructura básica de las principales isoflavonas

Antocianidinas

Las antocianidinas son pigmentos solubles en agua y son los responsables de la mayoría de colores rojos, azules y púrpuras de las flores, frutas y verduras (Mazza *et al.*, 2004). Las antocianidinas están presentes en las plantas, principalmente en su forma

glicosilada, denominada antocianina (Anderson, 2006). Se han descrito en la naturaleza cerca de diecisiete antocianidinas, de las cuales seis (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina) están ampliamente distribuidas en los alimentos (Jaganath *et al.*, 2010). La clasificación de las antocianinas depende del número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B (**Figura 7**).

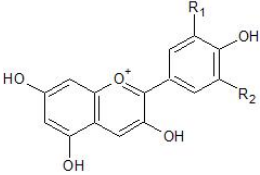
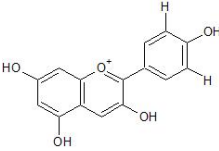
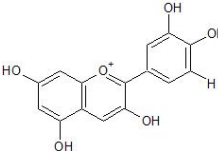
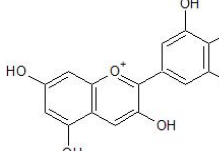
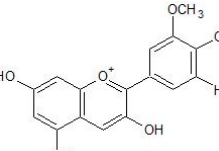
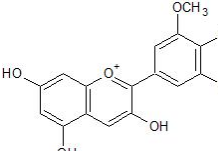
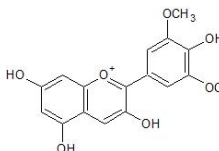
Antocianidinas			
Estructura Básica	Pelargonidina	Cianidina	Delphinidina
			
	Peonidina	Petunidina	Malvidina
			

Figura 7. Estructura básica de las principales antocianidinas

1.2.2.2. Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de la dieta

La estimación de la ingesta media de polifenoles comporta una gran dificultad debido a la complejidad de los compuestos, a los diferentes métodos analíticos, a la gran variabilidad individual de la ingesta, así como al diferente consumo entre países. Asimismo, las condiciones de conservación y preparación del alimento también influyen en la composición fenólica de los alimentos que ingerimos. Se han descrito varios trabajos que muestran que la concentración de polifenoles se reduce en porcentajes muy significativos durante el procesamiento industrial y culinario del alimento (Van der Sluis *et al.*, 2001). Estimar la ingesta diaria de polifenoles de una dieta es un elemento esencial para poder relacionar los efectos saludables con la cantidad y el tipo de alimentos ingeridos.

Aun así, estos datos son tan solo orientativos, pues el contenido de polifenoles en los alimentos vegetales puede variar en función de factores ambientales (variedad, climatología, condiciones pre-cosecha y post-cosecha, etc.), tipo de procesamiento industrial o preparación culinaria (Miglio *et al.*, 2008). Algunos autores estiman que la ingesta de polifenoles en la

dieta puede llegar a ser de hasta 1 g/día (Manach *et al.*, 2004; Scalbert *et al.*, 2005). Más recientemente, Tresserra-Rimbau *et al.* (2013) han estimado un consumo total de polifenoles totales en la población adulta española de 820 ± 323 mg/día, cantidad constituida principalmente por flavonoides (54 %) y ácidos fenólicos (37 %); el 9 % restante está representado por una mezcla de fenoles.

Estudios realizados en poblaciones de otros países estimaron un consumo de 863 ± 415 mg/ día en la población adulta finlandesa (Ovaskainen *et al.*, 2008) y de 1.172 y 1.031 mg/día en hombres y mujeres polacos adultos, respectivamente.

Sin embargo, más importante aún que el contenido polifenólico de los alimentos de la dieta es su biodisponibilidad. Desde un punto de vista nutricional, podría definirse como la fracción de un nutriente o compuesto ingerido que llega al sistema circulatorio y a los tejidos diana, donde pueden ejercer su acción biológica (Visioli *et al.*, 2011).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber (D'Archivio *et al.*, 2007). Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren numerosas modificaciones químicas. De hecho, estos compuestos se conjugan en las células intestinales y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación o glucuronidación en el hígado (Monagas *et al.*, 2010). Debido a estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas a las que están presentes en los alimentos, dificultando la identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica (Day *et al.*, 2001; Natsume *et al.*, 2003).

La estructura química de los polifenoles determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma. De hecho, la glucosilación afecta al grado de absorción de estos compuestos (D'Archivio *et al.*, 2010). Por ejemplo, la quercetina puede absorberse en el estómago, pero sus glucósidos se absorben en el intestino, donde se absorben mejor que la propia aglicona (Crespy *et al.*, 2002). Estudios recientes han estimado que las concentraciones en plasma de los polifenoles en su forma nativa raramente superan la concentración de 1 μM (Williamson *et al.*, 2005; Halliwell, 2008), mientras que la concentración de los metabolitos oscila entre 0,5- 30 μM (Monagas *et al.*, 2010), condicionada por el tipo de dieta y por la microflora de cada individuo. Asimismo, su mantenimiento en el torrente sanguíneo está relacionado con una ingesta constante de alimentos ricos en polifenoles (D'Archivio *et al.*, 2007).

2. Actividad biológica de la cebolla

Actividad antioxidante: los polifenoles presentes en la cebolla pueden ejercer un efecto protector antioxidante neutralizando directamente especies reactivas de oxígeno (ROS) y quelando metales, siendo la quercetina el flavonoide más representativo. Además, se ha observado que los polifenoles son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de estas especies reactivas (Chang *et al.*, 1993). En términos generales, a través de estos mecanismos de protección celular se limita el riesgo de daño oxidativo producido por los radicales libres que contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades.

Efectos cardiovasculares: diversos estudios han sugerido efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular a través de las defensas antioxidantes mejorando el metabolismo lipídico y la función endotelial, inhibiendo la agregación plaquetaria, reduciendo la presión sanguínea, disminuyendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y regulando la respuesta inflamatoria (Vauzour *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2011). Los polifenoles presentes en la cebolla son capaces de atenuar el inicio y la progresión de la aterosclerosis debido a su capacidad para disminuir la oxidación de las LDL. Además, son capaces de producir un incremento en la concentración de colesterol HDL en plasma e inhibir la proliferación del músculo liso vascular (Abe *et al.*, 2011; Osakabe *et al.*, 2001).

Además de los polifenoles, los compuestos organosulfurados son los principales compuestos activos implicados en los efectos hipolipídemicos e hipocolesterolémicos (Corzo-Martínez *et al.*, 2012). Los mecanismos de acción mediante los cuales los compuestos bioactivos de la cebolla ejercen su actividad hipolipemiente e hipocolesterolémica incluyen la inhibición hepática de lípidos y biosíntesis de colesterol que promueven la inactivación de enzimas tiol, o la reducción del nivel de NADPH en el tejido, por lo que favorece que no esté disponible para la síntesis de colesterol (Gupta y Porter, 2001) y potenciar así la conversión de colesterol en ácido biliar y su posterior excreción a través del tracto gastrointestinal (Srinivasan y Sambaiah, 1991).

Actividad antiinflamatoria: el estrés oxidativo produce aumento de enzimas implicadas en la liberación de agentes inflamatorios. Se ha demostrado que ciertos polifenoles presentes en la cebolla pueden modular la liberación de factores proinflamatorios implicados en diferentes mecanismos relacionados con el origen de

diversas enfermedades inflamatorias (Rodrigo *et al.*, 2012; Andújar *et al.*, 2011).

Diabetes y obesidad: los compuestos polifenólicos pueden inhibir la absorción de glucosa y, consecuentemente, disminuir sus niveles en sangre (Scalbert *et al.*, 2005). La quercetina inhibe la α -glucosidasa (Li *et al.*, 2009) bloqueando la absorción intestinal de los carbohidratos de forma más potente que la acarbosa, medicamento utilizado para tratar la diabetes, y por tanto se reduce la hiperglucemia postprandial. La prevención de la obesidad, así como la disminución de la hiperlipidemia y la hiperglucemia, se relaciona con el consumo de algunos polifenoles (Kwon *et al.*, 2007). Asimismo, estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos pueden reducir la viabilidad de los adipocitos y la proliferación de los preadipocitos (Chen *et al.*, 2015).

En el mismo sentido, diversos estudios han mostrado una relación entre los compuestos organosulfurados presentes en la cebolla y una mejora en la pérdida de peso, hiperglicemia y otras características de la diabetes *mellitus* (Sheela y Augusti, 1995).

Actividad anticancerígena: numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado el efecto protector en distintos tipos de cáncer que ejerce el consumo de polifenoles. Muchos de los polifenoles presentes en la dieta ejercen efectos protectores en los diferentes estadios de la carcinogénesis, especialmente en el tracto gastrointestinal, donde los polifenoles pueden encontrarse en grandes concentraciones (Weng y Yen, 2012; Martínez *et al.*, 2005).

Cabe destacar que parte de las propiedades anticancerígenas de la cebolla son debidas al alto contenido en compuestos organosulfurados. Numerosas investigaciones han mostrado que gran variedad de compuestos organosulfurados inhiben etapas tempranas y tardías en el cáncer de colon, estómago, esófago, glándulas mamarias, pulmón, hígado y riñón (Guyonnet *et al.*, 2001; Fukushima *et al.*, 2001; Bora y Sharma, 2009; Viry *et al.*, 2011).

Actividad neuroprotectora: el estrés oxidativo en las células neuronales durante el proceso del envejecimiento puede promover una excesiva muerte celular y ocasionar enfermedades neuroprotectoras como el Alzheimer y el Parkinson (Vauzour *et al.*, 2010; Trachootham *et al.*, 2008; Vauzour *et al.*, 2007). Diversos estudios afirman cierta actividad protectora de los polifenoles, puesto que, al conseguir atravesar la barrera hematoencefálica, pueden proteger frente a la apoptosis neuronal asociada con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Vauzour *et al.*, 2007; Kroon *et al.*, 2004). De esta

manera, pueden prevenir los daños neuronales ocasionados por el estrés oxidativo o el inducido por el péptido β -amiloide (en el caso de la enfermedad de Alzheimer) (Vauzour *et al.*, 2010).

Actividad antimicrobiana: los principales componentes bioactivos presentes en la cebolla que han mostrado propiedades antibacterianas mediante estudios *in vivo* son los derivados organosulfurados. Cabe destacar una gran actividad de dichos compuestos frente a la inhibición de bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas y cepas de *Escherichia coli* (Corzo-Martínez *et al.*, 2007; Škerget *et al.*, 2009). Además de los compuestos organosulfurados, ciertos polifenoles han demostrado tener un potencial efecto antibacteriano, antifúngico y antiviral (Rodrigo *et al.*, 2011). Así, se ha descrito que los flavonoides tienen efectos prebióticos, como la bioconversión intestinal de flavonoides, pudiendo estimular el crecimiento de especies bacterianas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y que pueden haber sido en parte responsables de la inhibición de la agregación plaquetaria y la modulación del estímulo de las citoquinas (Griffiths *et al.*, 2002; Monagas *et al.*, 2009; Cardona *et al.*, 2013). Además, ciertos estudios afirman que algunos polifenoles impiden el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Candida albicans* (Rodrigo *et al.*, 2011). Respecto a las propiedades antivirales, se ha comprobado que los polifenoles del té inhiben la entrada del virus VIH-1 dentro de sus células diana (Pandey *et al.*, 2009).

2.1. Actividad antioxidante

2.1.1. Estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas, en las células existe un equilibrio entre la generación de las especies reactivas de oxígeno (denominados ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*) y su neutralización por parte de las defensas endógenas antioxidantes. En esta situación de homeostasis, las vías de señalización celular sensibles a los cambios redox pueden realizar sus funciones adecuadamente favoreciendo la supervivencia celular. Sin embargo, cuando se produce un aumento de las ROS, rompiendo así la homeostasis redox, la célula entra en una situación de estrés oxidativo. En condiciones de estrés oxidativo, las principales macromoléculas celulares (ADN, proteínas y lípidos) pueden sufrir daños oxidativos y las vías de señalización sensibles a los cambios redox pueden producir respuestas anómalas que conducen a una muerte celular excesiva e incluso al desarrollo de

enfermedades (Trachootham *et al.*, 2008). El oxígeno es un elemento básico en la respiración celular e indispensable para la supervivencia de un ser vivo. El oxígeno captado por la célula animal es usado en la mitocondria para producir gran parte de la energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) necesaria para la supervivencia celular. Como consecuencia del metabolismo celular, aproximadamente el 1-2 % del oxígeno consumido es transformado en especies reactivas de oxígeno (ROS) y en especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Raza, 2011). Ambas también se pueden formar durante procesos endógenos y por las acciones enzimáticas. La principal fuente endógena de generación de ROS es el metabolismo mitocondrial de oxígeno. Además, algunas especies reactivas son formadas por fuentes exógenas, debido a las interacciones de compuestos xenobióticos con la propia célula (Gülçin, 2012; Ray *et al.*, 2012).

Los ROS y RNS incluyen tanto radicales libres como el radical peroxilo (ROO^\bullet), hidroxilo (OH^\bullet), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el óxido nítrico (NO^\bullet) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), así como moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el peroxinitrito (ONOO^-) o el anión nitroxilo (NO^-), entre otros, todas ellas moléculas altamente reactivas y fácilmente convertibles en radicales. Un radical libre es cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados en sus orbitales y que son altamente reactivos (Gülçin, 2012).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio a corto o largo plazo entre antioxidantes/prooxidantes que provoca la disrupción de los sistemas de señalización y control a consecuencia de favorecer los procesos de prooxidación. En esta situación, los ROS y RNS son capaces de interactuar con macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos oxidando sus estructuras químicas y causando daños en ellas (Ioannidis *et al.*, 2011).

Muchas son las investigaciones que confirman que el estrés oxidativo es uno de los principales factores del desarrollo de la disfunción endotelial y del inicio y el desarrollo de los diferentes estadios de evolución de la placa de ateroma y de la subsecuente enfermedad cardiovascular (Heitzer *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2009). Asimismo, el estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos donde se ve alterada la funcionalidad celular como diabetes, Alzheimer, Parkinson, enfermedades neurológicas, cáncer, artritis o infarto de miocardio, entre otras (Butterfield *et al.*, 2002; Dai y Mumper, 2010; Lee *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009).

2.1.2. Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Sustancia antioxidante es aquella que, encontrándose en bajas concentraciones en comparación a la concentración del sustrato oxidable, previene o retarda su oxidación (Gutteridge, 1994). El organismo de un ser vivo aerobio dispone tanto de un sistema antioxidante endógeno como de otro exógeno. La primera línea de defensa del organismo incluye enzimas antioxidantes como la superóxido-dismutasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión-transferasa y la catalasa, entre otras. En ocasiones, cuando la concentración de ROS es muy elevada, el sistema antioxidante endógeno no es efectivo por sí solo y necesita antioxidantes exógenos como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenoles y ciertos compuestos organosulfurados, que, principalmente, son compuestos donadores de hidrógenos, quelantes de metales relacionados con la oxidación y captadores de radicales libres. En general, los principales mecanismos de acción de las sustancias antioxidantes son:

- a) Captación de radicales libres del medio evitando el proceso oxidativo.
- b) Prevención de la formación de radicales libres, por ejemplo, actuando como agentes quelantes de iones de metales de transición, dado que al unirse a ellos reducen la capacidad de éstos para generar radicales libres mediante reacciones de Fenton (Gülçin *et al.*, 2010).
- c) Regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

El medio de actuación en el que se encuentran los compuestos antioxidantes puede modular su acción. Así, se ha observado que en medios hidrofóbicos los ácidos dihidroxifenólicos son más antioxidantes que los trihidroxifenólicos, al contrario de lo que ocurre en medio acuoso, debido a sus mayores coeficientes de partición. De la misma forma, en medios hidrofóbicos parece ser que el sustituyente del anillo fenólico tiene una importancia menor que en el medio acuoso (Siquet *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010).

La capacidad antioxidante de los compuestos puede ser evaluada tanto en alimentos como en sistemas biológicos. Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante se pueden clasificar en dos grupos: los que evalúan la oxidación de moléculas diana (como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN) y los basados en la medida de la captación de radicales libres. La mayoría de los ensayos de medición de la capacidad antioxidante se basan en transferencia de hidrógenos o de electrones (Huang *et al.*, 2005).

1. Método para evaluar la oxidación de moléculas diana

Los principales métodos se basan en la medida de los productos terminales producidos en la oxidación de lípidos como moléculas diana, puesto que son susceptibles de desarrollar procesos de oxidación no controlados inducidos por radicales libres, especialmente los que contienen ácidos grasos poliinsaturados.

La peroxidación lipídica es el proceso oxidativo que resulta de una serie de reacciones en cadena en las que un solo radical libre puede causar la oxidación de un gran número de moléculas de la membrana, dando lugar a diversidad de compuestos fácilmente medibles y empleados para cuantificar la capacidad antioxidante de un sustrato. El hidroxinonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA) son dos de los principales subproductos electrofílicos producidos durante el estrés oxidativo, siendo el MDA comúnmente utilizado como marcador de peroxidación lipídica (Maes *et al.*, 2011). Por otro lado, también hay que considerar los métodos basados en la medida de los productos finales resultantes de la oxidación de proteínas (medida del contenido de carbonilos totales) y ADN (medida de la formación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina).

2. Métodos para evaluar la captación de radicales libres

Una evaluación adecuada de la actividad antioxidante requiere del uso de distintas técnicas analíticas con el fin de elucidar los diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes. De este modo, las propiedades antioxidantes, mediante la medida de la captación de radicales libres de los compuestos y la evaluación de sus propiedades reductoras, pueden ser evaluadas *in vitro* fundamentalmente por varios métodos (Gülçin, 2012; Antolovich *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005).

a) Secuestro de radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$): la fuente enzimática usada es la xantina-oxidasa o por fotoquimioluminiscencia (FCL/Photochem): método que mide la capacidad de los antioxidantes de unirse al radical superóxido de sistemas liposolubles e hidrosolubles. La excitación mediante irradiación de la sustancia fotosintetizadora (luminol) produce radicales libres (radical superóxido) que, al interactuar con el antioxidante, disminuirá la señal fotoquimioluminiscente en función de la concentración.

b) Secuestro del peróxido de hidrógeno (H_2O_2): uno de los ensayos más comunes para medir el secuestro de H_2O_2 es mediante el uso de peroxidasa de rábano para oxidar escopoletina a un producto no fluorescente. En presencia de antioxidantes, la

oxidación se inhibe.

c) Secuestro de radicales hidroxilo (OH^\bullet): se evalúa con el test de la desoxirribosa. En presencia de ascorbato, el OH^\bullet formado por reacción entre el $\text{Fe}^{+3}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ reacciona con el azúcar y origina productos reactivos con el tiobarbitúrico, dando lugar a un compuesto rosa que es cuantificado por espectrometría.

d) Secuestro del radical peroxinitrito (ONOO^-): el método principal de medición es el test dehidro-rodamina 123 (123-DRH). El 123-DR, en presencia de productos de oxidación, ONOO^- , se transforma en 123-rodamina fluorescente. La inhibición se mide por fluorimetría.

e) Secuestro del radical peroxilo (ROO^\bullet): mide la capacidad de captar radicales peroxilo generados a partir del 2,2'-azabis(2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH) mediante transferencia de hidrógenos:

- *Potencial de captación total de radicales* (TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter): este método mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para interferir en la reacción entre radicales peroxilo generados por AAPH. La oxidación se mide mediante el consumo de oxígeno con electrodos o por fluorescencia.
- *Capacidad de captación de radicales oxigenados* (ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity): es uno de los métodos más relevantes para sistemas biológicos. Su fundamento se basa en la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. En este método, el radical AAPH oxida a la fluoresceína midiendo la degradación oxidativa de la molécula fluorescente.
- *Capacidad secuestradora de radicales de oxígeno totales* (TOSC: Total Oxyradical Scavenging Capacity): permite la cuantificación de la capacidad de absorción de radicales de los antioxidantes. El método se basa en la oxidación del ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico a estilbeno por radicales generados por AAPH. La formación de etileno es inhibida por los antioxidantes y puede determinarse por cromatografía de gases.

f) Secuestro del radical catión ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) o capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity): se basa en la capacidad de los antioxidantes de reducir directamente el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ por transferencia de electrones. El cromóforo azul-verde con absorción máxima a 734 nm se mide por espectrofotometría, y su intensidad disminuye en presencia de antioxidantes.

g) Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo ($DPPH^{\bullet}$): el radical $DPPH^{\bullet}$ es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estable, tiene un color púrpura intenso. El ensayo se basa en la donación de electrón de los antioxidantes para neutralizar el radical $DPPH^{\bullet}$, acompañado de un cambio de color medido a 517 nm. La decoloración actúa como indicador de la eficacia antioxidante y puede ser expresado como EC50, que se define como la concentración del antioxidante necesaria para disminuir en un 50 % la concentración inicial de $DPPH^{\bullet}$.

h) Secuestro del radical catión N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD): mide la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir el radical catión $DMPD^{\bullet+}$, causando una decoloración de la solución proporcional a la concentración del catión, medida a una absorbancia de 505 nm. Se usa principalmente para medir compuestos hidrofílicos.

i) Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR): es la única técnica que puede medir específicamente los radicales libres. Sin embargo, la corta vida de los radicales y la baja concentración en estado estacionario dificulta su detección a concentraciones inferiores a la concentración mínima detectable (10^{-9} M). Para poder ser detectados por espectrometría, se asocian los radicales libres con otros compuestos como el N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO) para formar aductor.

3. Otros métodos basados en el poder reductor

a) Capacidad de reducción férrica (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power): determina la capacidad de reducción por transferencia de electrones del paso del complejo incoloro $TPTZ-Fe^{3+}$ al complejo azulado $TPTZ-Fe^{2+}$, generando así una coloración de intensidad proporcional a la actividad que puede cuantificarse por espectrofotometría a una longitud de onda de 593 nm. Puede ser expresado como $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ o como equivalentes de

un estándar. Es un método rápido y reproducible para medir la actividad en fluidos biológicos.

b) Ensayo Folin-Ciocalteu de capacidad reductora: se basa en transferir electrones del compuesto antioxidante al molibdeno del reactivo, formándose un complejo azulado que absorbe a 750 nm. Este método ofrece una estimación del valor antioxidante total.

2.2. Actividad antiinflamatoria

2.2.1. Inflamación

La inflamación es un mecanismo homeostático que se desencadena ante una agresión en un tejido vascularizado, consta esencialmente de cinco etapas: liberación de mediadores, efecto de los mediadores, llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, regulación del proceso inflamatorio y reparación. La principal finalidad es la reparación de la lesión tisular y la eliminación de las células y tejidos necróticos (Kumar *et al.*, 2005). En general, la respuesta inflamatoria está generada por los agentes inflamatorios, entre los que se encuentran barreras epiteliales, células (macrófagos) y proteínas circulantes (citoquinas, mediadores de inflamación, etc.) que reconocen al agente agresor e inician respuestas que dan lugar a la inflamación.

Citoquinas: son proteínas sintetizadas durante las respuestas a estímulos inflamatorios que actúan como mensajeros intercelulares que suelen intervenir en la maduración y la amplificación de la respuesta inmunitaria, provocando múltiples actividades biológicas, entre las cuales modula algunas funciones inflamatorias o de quimiotaxis. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos y los macrófagos activados. Las principales son el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1).

Quimioquinas: son citoquinas con actividad quimiotáctica. Cumplen un importante papel en la coordinación del flujo linfocitario a través de todo el cuerpo durante la vigilancia inmunológica y en la dirección de complejos movimientos celulares durante el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos. Además, tienen efectos sobre células del sistema nervioso y el endotelio, donde ejercen efectos angiogénicos. Las quimioquinas β actúan sobre los monocitos, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), bajo la estimulación

de lipopolisacáridos (LPS) o $\text{TNF-}\alpha$.

Óxido nítrico: es un compuesto volátil sintetizado a partir de la L-arginina, el oxígeno molecular, el NADPH y otros cofactores mediante la acción de la enzima nitrato sintasa (NOs). Existen tres isoformas de esta enzima: la NOs endotelial (eNO), la NOs neuronal (nNO) y la NOs inducible (iNO). En condiciones fisiológicas normales, la eNO ejerce una función importante en el control del tono vascular y la nNO actúa como neurotransmisor en el tejido neuronal; ambas son isoformas constituidas dependientes de la elevación de la concentración del calcio intracelular que producen óxido nítrico a bajas concentraciones. Sin embargo, la iNOs es inducible bajo diferentes estímulos; en macrófagos y endotelio, por estímulos proinflamatorios o por citoquinas como el interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) y el $\text{TNF-}\alpha$, ocasionando la sobreproducción de óxido nítrico y sus metabolitos, como el ONOO^- . Estos son compuestos muy tóxicos y pueden actuar como radicales libres, capaces de lesionar y destruir células y tejidos.

Moléculas de adhesión celular (CAM): son receptores de membrana que intervienen en diversas funciones relacionadas con el tráfico celular, con interacciones entre células y con la adhesión de células a la matriz extracelular. Entre ellas se encuentran la molécula de adhesión vascular-celular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1).

Angiotensina II (Ang II): péptido del sistema renina-angiotensina formado a partir de la angiotensina I (Ang I) por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Interviene en el reclutamiento y la regulación de moléculas de adhesión, quimioquinas y el factor de crecimiento. Además, es un potente vasoconstrictor, estimula la liberación de aldosterona promoviendo la retención de sodio y agua, lo que da lugar a un aumento de la presión arterial.

2.2.2. Estrés oxidativo e inflamación en estados de hipercolesterolemia

En la actualidad, una de las patologías más comunes relacionada con la hipercolesterolemia es la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad progresiva en las arterias de calibre mediano y grueso que conlleva la formación de lesiones en la capa íntima, caracterizada por un engrosamiento a causa de una compleja interacción entre la pared vascular y los componentes presentes en la sangre donde pueden intervenir procesos inflamatorios, acumulación lipídica, muerte celular y fibrosis (**Figura 8**). Dichas lesiones

son conocidas como «placas ateroscleróticas», maduran y adquieren nuevas características.

La formación de la placa de ateroma da lugar a una estenosis en la luz del vaso con la consecuente disminución del flujo sanguíneo (Hansson y Libby, 2006). El ateroma crece hasta su ruptura, ocasionando la formación del coágulo o trombo, la consecuente isquemia en los tejidos y el bloqueo de la circulación (Lusis, 2000; Newby, 2005).

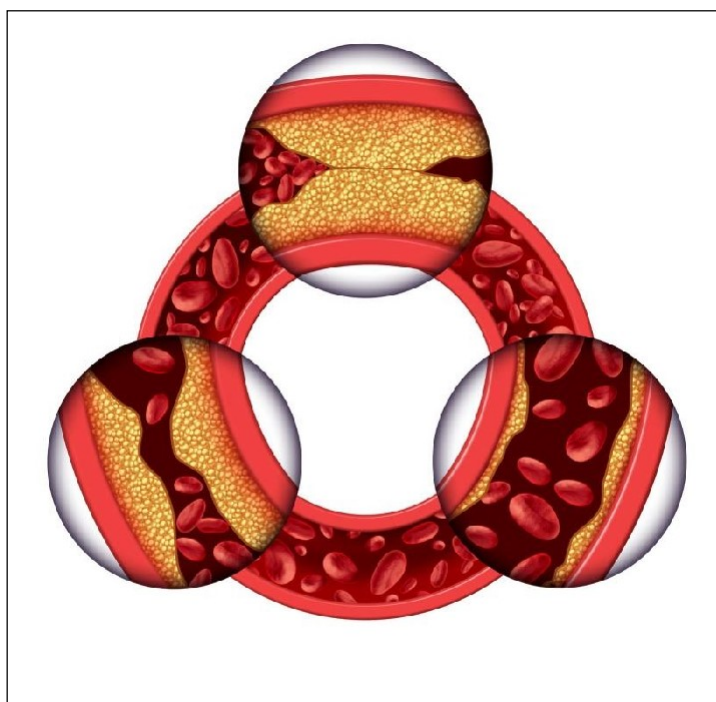


Figura 8. Comparación de los diferentes estadios de la placa aterosclerótica
Fuente: <https://es.123rf.com/>

La formación de la placa aterosclerótica es el resultado de la intervención de diferentes mecanismos producto de la acción de diferentes tipos celulares. Numerosos autores mencionan tres o cuatro etapas en el proceso de aterosclerosis: daño endotelial o formación de la estría grasa, formación de la placa fibrosa, placa inestable y, finalmente, ruptura o formación del trombo. A continuación se describen los eventos principales que ocurren en estas etapas (**Figura 9**).

1. Daño endotelial o formación de la estría grasa

El inicio de la enfermedad se caracteriza por la creación de daño en la monocapa de células endoteliales que está delimitando la superficie arterial interna. El endotelio actúa como una barrera selectivamente permeable entre la sangre y los tejidos; además, genera moléculas efectoras que regulan el desarrollo de la trombosis, la inflamación, el tono y la remodelación vascular (Lusis, 2000; Cunningham y Gotlieb, 2005). El daño generado por el

estrés oxidativo propicia una disfunción endotelial y activa diversas vías proinflamatorias que son los mecanismos clave en la aterosclerosis (Grassi *et al.*, 2011; Pashkow, 2011).

El primer paso que tiene lugar en la aterosclerosis es la acumulación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) en la matriz subendotelial. En situaciones de exceso de lipoproteínas de baja densidad circulantes (LDL), se produce un aumento del transporte y la retención de ellas en los lugares donde la permeabilidad es mayor. Parte de la disfunción endotelial se debe a un aumento en la formación de ROS a nivel mitocondrial y a una disminución de la actividad del NO (Blasi, 2008). En condiciones de estrés oxidativo, las LDL son susceptibles de sufrir procesos de oxidación dando lugar a LDL oxidadas (LDLox), que estimulan a las células endoteliales induciendo la expresión de citoquinas (IL-1 y TNF- α), quimioquinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina y E-selectina). El aumento en la expresión de moléculas de adhesión va a favorecer la infiltración de monocitos y linfocitos al sitio de lesión y la posterior transformación de éstos a macrófagos. Una vez que los monocitos transmigran a las zonas de lesión, se transforman en macrófagos. Estos fagocitan las LDLox, favoreciendo la formación de células espumosas, fundamentalmente en el inicio y en la progresión de la aterosclerosis (Packard *et al.*, 2009). Las HDL ejercen un papel protector fundamental en la aterosclerosis por un doble mecanismo: por un lado, retiran el exceso de colesterol acumulado en la matriz subendotelial y en el interior de las células espumosas (Tall *et al.*, 2000), y por otro lado, protegen de la oxidación lipídica, en parte debido a la presencia en dicha lipoproteína de la enzima paraxonasa sérica que degrada ciertos fosfolípidos biológicamente activos (Barter *et al.*, 2004). La acumulación de las células espumosas en la íntima origina la formación de estrías grasas (Ford *et al.*, 2008).

2. Formación de la placa fibrosa

Posteriormente se forma la placa fibrosa, proceso que se inicia con la migración de las células musculares lisas desde la capa media hacia la matriz subendotelial, lugar donde las células proliferan y captan las lipoproteínas modificadas y, junto con las células espumosas, contribuyen al engrosamiento del núcleo lipídico. Las células musculares lisas son las mayores productoras de proteínas de matriz extracelular, mayoritariamente proteoglicanos y fibronectina en las zonas de lesión, conduciendo así al desarrollo de la placa fibrosa (Glass y Witztum, 2001).

Durante todo el proceso aterosclerótico, los distintos componentes celulares mueren

por apoptosis. Asimismo, un aumento en la concentración de LDLox favorece la saturación de las vías metabólicas implicadas en la modificación de lipoproteínas en los macrófagos, con la posterior acumulación del colesterol libre, provocando una situación de estrés en el retículo endoplasmático, desencadenando así la apoptosis del macrófago y la formación del núcleo necrótico (Martinet y Kockx, 2001).

3. Placa inestable

En función de la fase del proceso de aterosclerosis, los procesos de apoptosis van a tener consecuencias muy distintas. En las lesiones iniciales, las células apoptóticas van a ser eficazmente fagocitadas por macrófagos; sin embargo, lesiones en estadios más avanzados sufren una deficiencia en la eliminación de las células apoptóticas (Gui *et al.*, 2012; Tabas, 2005). El hecho de que no exista una correcta eliminación de las células apoptóticas favorece una serie de procesos que contribuyen a crear una placa más inestable, con el consecuente aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias y la reducción de la expresión de citoquinas antiinflamatorias. La salida de las células inflamatorias del ateroma frenaría el curso de la aterosclerosis. Sin embargo, este proceso está disminuido en condiciones de hipercolesterolemia (Angeli *et al.*, 2004).

4. Formación de trombos

La última fase en el proceso de la aterosclerosis es la formación de trombos, dependen principalmente de la composición y la vulnerabilidad de la placa. Para la formación de trombos debe haber una ruptura de la superficie de la lesión, dejando así expuesto el contenido subendotelial a la luz del vaso y se debe producir la erosión de la capa fibrosa (Rader y Daugherty, 2008).

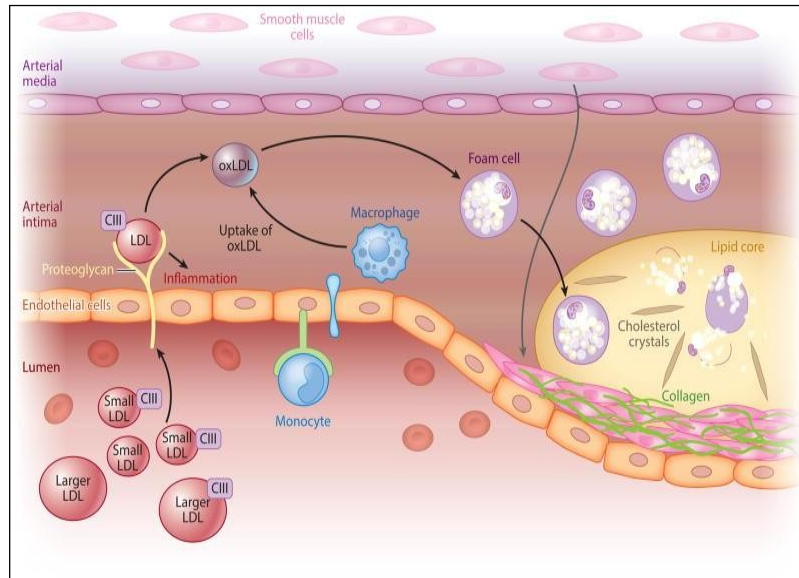


Figura 9. Proceso de la aterosclerosis. (Siri-Tarino et al., 2015)

3. Procesado de alimentos por alta presión hidrostática

Las tecnologías de procesado y conservación de alimentos denominadas tecnologías no-térmicas, como la alta presión hidrostática (APH), han recibido gran atención por parte de investigadores e industriales, ya que no sólo permiten la obtención de alimentos seguros, saludables y convenientes, manteniendo su calidad sensorial y organoléptica, sino que pueden llegar a incrementar o mejorar la extractabilidad de determinados compuestos bioactivos, y por tanto pueden ser utilizadas para la funcionalización de alimentos y la obtención de ingredientes funcionales (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b).

El potencial de las altas presiones hidrostáticas para la conservación de alimentos se conoce desde el siglo XIX, cuando el grupo de investigación dirigido por Hite en 1899 estudió el efecto de las APH en la leche, quedando demostrada la reducción de la población microbiana. Años más tarde se estudiaron los efectos de las altas presiones en la clara de huevo, así como los efectos en la conservación de frutas, hortalizas y carne (Hoover *et al.*, 1989). Sin embargo, tras un periodo de menor actividad investigadora en el área debido a limitaciones en el campo de la ciencia de los materiales, esta técnica no comenzó a desarrollarse con fines comerciales hasta finales del siglo XX en Japón (Rastogi *et al.*, 2007).

3.1. Fundamento

Las altas presiones hidrostáticas constituyen una técnica de procesado donde el alimento sólido o líquido previamente envasado en un formato final flexible, se somete a presiones de entre 100 y 1000 MPa, siendo el agua el vehículo de transmisión de la presión, en un rango de temperatura de 0 a 100 °C durante un tiempo variable que oscila entre unos pocos segundos hasta veinte minutos (San Martín *et al.*, 2002).

La tecnología de las altas presiones se basa en dos principios fundamentales (Valdez-Fragoso *et al.*, 2011):

a) Principio de Le Châtelier: este principio fue enunciado en 1884, e indica que los fenómenos acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión, y viceversa. Según este principio, la aplicación de la alta presión aumenta la velocidad de las reacciones que involucran una disminución del volumen (reacciones químicas, modificación de las conformaciones moleculares) y retarda aquellas donde el volumen aumenta. En principio, la formación de enlaces de hidrógeno, la ruptura

de interacciones hidrófobas y de pares de iones en una macromolécula proteica se acompañan de una restricción de volumen favorecida por la presión (Cheftel, 1991). No obstante, otros estudios indican que los puentes de hidrógeno prácticamente no se ven afectados por la presión (Gross y Jaenicke, 1994; Mozhaev *et al.*, 1994).

b) Ley de Pascal o ley de la transmisión isostática de la presión: el aumento de la presión aplicado a un fluido incompresible (en este caso, agua) contenido en un recipiente indeformable se transmite de forma instantánea y uniforme en todas las direcciones. La presión aplicada se transmite de forma uniforme y casi instantánea a todos los puntos del alimento, independientemente del tamaño, composición y forma geométrica (Oey *et al.*, 2008), evitando así la deformación del producto.

3.2. Aspectos tecnológicos y equipamiento

El tratamiento por altas presiones se aplica a aquellos alimentos sólidos y líquidos previamente envasados al vacío en un envase flexible. No se aplica en alimentos envasados en recipientes rígidos, como podría ser envases de cristal o lata, ni en alimentos sólidos que incluyan aire, por ejemplo pan o *mousse*.

Los parámetros críticos que se deben controlar en el diseño de cualquier tratamiento por altas presiones son la presión, el tiempo, la temperatura y la velocidad de presurización. Las presiones habituales de trabajo oscilan entre los 350 y los 800 MPa (Heinz y Buckow, 2010), si bien a nivel comercial la presión más utilizada por la industria es de 600 MPa. Respecto al tiempo, es importante considerar la duración del tratamiento a la presión deseada, el tiempo requerido hasta lograr dicha presión y el tiempo de descompresión postratamiento hasta obtener niveles de presión atmosférica. El rango de temperaturas que pueden combinarse con las altas presiones para obtener productos microbiológicamente seguros, es muy amplio, puede ser suficiente con aplicar temperaturas suaves, de 10 a 40 °C (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Hasta la fecha, los tratamientos por altas presiones, solos o combinados con temperaturas suaves, son tratamientos de pasteurización (pasteurización fría) ya que no se consiguen inactivar esporas microbianas, por lo que los productos presurizados necesitan ser conservados en refrigeración. Se están estudiando tratamientos por altas presiones combinados con temperaturas más elevadas (60-90 °C) con el fin de conseguir la esterilización de los productos por inactivación completa de las formas vegetativas y las esporas microbianas (Black *et al.*, 2007). Respecto a la temperatura, hay

que tener en cuenta la temperatura inicial del producto y la distribución de dicha temperatura en el recipiente a la presión prefijada, así como los cambios de temperatura que tienen lugar durante la compresión/descompresión (calentamiento/enfriamiento adiabático). En este sentido, cabe destacar que la compresión aumenta uniformemente la temperatura de los alimentos unos 3 °C por cada 100 MPa, aunque dicho aumento es mayor, en torno a los 8 o 9 °C por cada 100 MPa, en alimentos muy grasos (Rasanayagam *et al.*, 2003). La efectividad de los tratamientos por altas presiones también depende de otros factores como son la composición del producto (por ejemplo: el contenido alto en grasa o sal), el pH, la actividad de agua además de las características del envase utilizado. La efectividad del tratamiento por altas presiones es mayor cuanto menor sea el pH del alimento tratado.

Los componentes principales de un sistema de presurización son fundamentalmente: una cámara de presurización (vasija cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de presión generalmente constituido por una o más bombas hidráulicas, un fluido para transmitir la presión, los multiplicadores de presión, un equipo de termostatación de la vasija de tratamiento y un sistema de registro y control de temperatura y presión (Patterson y Linton, 2010).

Principalmente, existen dos tipos de métodos:

1. Compresión directa o modo discontinuo: la presión se genera directamente en el interior de la cámara por la compresión del fluido de presurización en el que el alimento previamente envasado se encuentra inmerso.
2. Compresión indirecta o modo semicontinuo: el fluido de presurización es enviado hacia la cámara por una bomba o intensificador, el fluido a su vez empuja un pistón que aplica la presión directamente sobre un producto líquido, semilíquido o particulado sin envasar.

Los equipos empleados se clasifican según su funcionamiento en equipos de tipo discontinuo y equipos de tipo semicontinuo, siendo el modo discontinuo el más empleado por la industria alimentaria. Las etapas que integran el modo discontinuo son las siguientes (**Figura 10**):

1. Llenado de la vasija con el fluido presurizante (normalmente, agua).
2. Introducción del producto a presurizar previamente envasado.
3. Cerrado de la vasija y la válvula.
4. Aumento de la presión hasta alcanzar los valores establecidos. Se sustituye el aire de

la cámara por el fluido de presurización hasta su llenado completo. Una vez alcanzada la presión deseada, la válvula que cierra el circuito permitirá el mantenimiento de la presión durante el tiempo preciso.

5. Una vez finalizado el tratamiento, tiene lugar la descompresión de la vasija.
6. Extracción de las muestras tratadas.

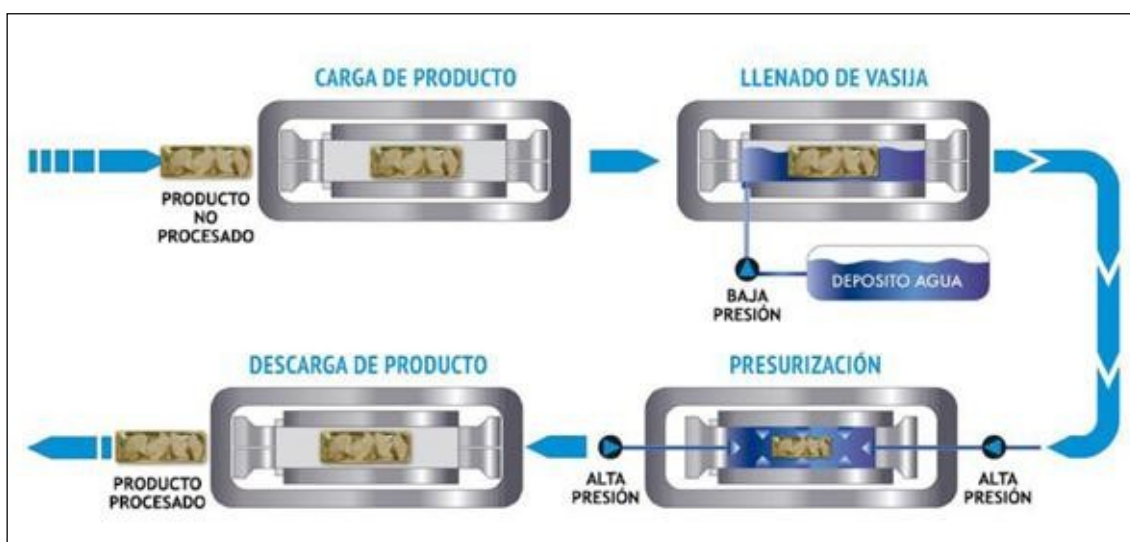


Figura 10. Esquema de las etapas del tratamiento con altas presiones.

Fuente: <http://www.hiperbaric.com/es/>

3.3. Efecto de las altas presiones sobre los alimentos

3.3.1. Efecto de las altas presiones sobre nutrientes y compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son aquellos compuestos presentes en los alimentos de forma natural que pueden ser nutrientes o no (como las vitaminas y los polifenoles) y que tienen un efecto sobre la salud humana que va más allá de la nutrición básica (Biesalski *et al.*, 2009). Los compuestos bioactivos presentan actividad biológica dentro del organismo con efectos beneficiosos para la salud y contribuyen a disminuir el riesgo de padecer determinadas enfermedades. Además, son los que le confieren al alimento aquellas características específicas que lo convierten en funcional.

Hoy en día, los consumidores valoran positivamente aquellos alimentos que, aparte de preservar las propiedades nutricionales, presentan características funcionales.

El procesado con altas presiones proporciona una oportunidad única para desarrollar una nueva generación de alimentos con valor añadido, presentando una calidad sensorial y

nutricional superiores a los producidos con los tratamientos térmicos convencionales. La aplicación de las altas presiones afecta a la estructura de la membrana celular, dando lugar a cambios significativos en la microestructura de la matriz alimentaria, como, por ejemplo, la ruptura de la pared celular de los orgánulos que encierran determinados compuestos, favoreciendo la reacción de las enzimas con sus correspondientes sustratos que si no son inactivadas por la acción de la presión, pueden dar lugar a cambios no deseados en la calidad sensorial (color, textura, aroma), nutricional y funcional. Por otro lado, la disrupción celular producida por las altas presiones puede favorecer la salida de nutrientes y compuestos bioactivos de los orgánulos en los que están confinados en las células vegetales, lo que puede favorecer la extracción de ciertos nutrientes y compuestos bioactivos, mejorando su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Oey *et al.*, 2008; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b; Parada y Aguilera, 2007).

Los compuestos bioactivos presentan una mayor estabilidad en tratamientos con alta presión en comparación con el tratamiento térmico, dado que la alta presión afecta solo a los enlaces no covalentes (interacciones hidrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas), provocando que macromoléculas como las cadenas de proteínas se desdoblén a alta presión y desnaturalicen bajo alta presión; pero tiene poco efecto sobre los constituyentes químicos asociados con la calidad de los alimentos, tales como el sabor, color y compuestos nutricionales.

El comportamiento de los compuestos bioactivos frente a las altas presiones depende de la intensidad aplicada y la matriz estudiada; así pues, es necesario un estudio caso por caso (Barba *et al.*, 2012; Oms-Oliu *et al.*, 2012).

Las vitaminas del grupo B (tiamina [B₁], riboflavina [B₂] y piridoxal [B₆]) permanecen estables tras el tratamiento con altas presiones (Gabrovska *et al.*, 2005; Butz *et al.*, 2007), mientras que el ácido fólico presenta una mayor sensibilidad a las altas presiones debido a la desglutamilación de los folatos, y a la degradación de folato que aumenta al aumentar la presión a temperatura constante y al aumentar la temperatura a presión constante (Nguyen *et al.*, 2003; Verlinde *et al.*, 2008). Otro factor que debemos tener en cuenta respecto a la sensibilidad de los folatos es la concentración de ácido ascórbico endógeno: en su presencia se retarda la degradación de folatos (Indrawati *et al.*, 2004; Oey *et al.*, 2006). En este sentido, estudios realizados con brócoli, judías verdes, coliflor y puerros presurizados (100-600 MPa/25-45 °C/5-30 min) observaron pérdidas en la

concentración total de folatos (Melse-Boonstra *et al.*, 2002; Verlinde *et al.*, 2008).

Por otro lado, la concentración de vitamina C (ácido ascórbico) no se ve comprometida por acción de las altas presiones a temperaturas moderadas (<60 °C) (Bull *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b).

Frutas como naranjas, manzanas, puré de manzana, zumos de diferentes cítricos, zanahorias, tomates y frambuesas presurizadas (400-800 MPa/25-44 °C/6 min) presentaban concentraciones similares de vitamina C que las muestras no tratadas (Butz *et al.*, 2002; Landl *et al.*, 2010). Otros estudios realizados con zumo de naranja (Navel y Valencia) presurizado (400 MPa) a temperaturas moderadas (40 °C) observaron una baja reducción de <9 % de vitamina C total (Bull *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005). A temperaturas por encima de los 65 °C, la aplicación de la alta presión conlleva un calentamiento adiabático del producto, dando lugar a pérdidas de ácido ascórbico más elevadas (Oey *et al.*, 2008). Los resultados observados en distintos estudios muestran que la estabilidad de la vitamina C depende significativamente de la composición del alimento y del tratamiento de alta presión aplicado. Además, se debe tener en cuenta otras posibles vías de degradación del ácido ascórbico como la oxidación química y enzimática que pueden tener lugar en los alimentos presurizados (Barret y Lloyd, 2012).

El contenido de vitamina A en alimentos vegetales presurizados como zumo de naranja también puede incrementarse significativamente con la presión, tiempo de tratamiento y temperatura. Así, zumos de naranja procesados por altas presiones (100-300 MPa) combinados con temperaturas suaves (30-60 °C) y distintos tiempos de tratamiento (2,5- 15 min), mostraron un aumento de la concentración de vitamina A entre 45-52 % (De Ancos *et al.*, 2002). En otro estudio realizado por Sánchez-Moreno *et al.* (2005) con zumo de naranja tratado a 400 MPa/40 °C/1 min se observó un aumento de vitamina A del 39 %, posiblemente causado por un aumento de la extractabilidad de los compuestos carotenoides con actividad de pro-vitamina A.

En general, se ha observado que en las matrices vegetales tratadas por altas presiones tiene lugar un incremento de la extracción de los compuestos carotenoides. Se ha observado que el grado del incremento de extractabilidad depende de la estructura química del carotenoide (β -caroteno, licopeno, etc.), del tipo de matriz vegetal en el que se encuentre y también de la integridad de la matriz alimentaria (troceado, triturado, exprimido, etc.) (Barret y Lloyd, 2012). En 2008, en un estudio realizado con zumo de tomate presurizado a

300 MPa/4-25 °C/10 min observaron un incremento del 56-62 % en niveles de licopeno y carotenoides totales (Hsu *et al.*, 2008). Además, se ha observado que el incremento de la extractabilidad de los compuestos carotenoides depende del tipo de vegetal y de la variedad. Así, De Ancos *et al.* (2000) observaron un incremento del 9 % y del 27 % en la concentración de carotenoides totales en puré de caqui de la variedad Rojo Brillante y Sharon, respectivamente, si bien a nivel individual se observaron diferencias de comportamiento entre los carotenoides. Es decir, los carotenoides mayoritarios como β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, licopeno, zeaxantina, etc., incrementan o reducen su concentración en alimentos presurizados dependiendo de la matriz vegetal en la que se encuentren. (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003; Jun, 2006; Wolbang *et al.*, 2008).

Respecto al comportamiento de las antocianinas en alimentos presurizados, existen datos que muestran tanto incremento como reducción de su concentración. Patras *et al.* (2009) observaron niveles prácticamente inalterados de antocianos en puré de moras y frambuesas tratadas con altas presiones (400-600 MPa/ 10-30 °C/15 min). Sin embargo, en zumo de granada (400-600 MPa/5-10 min) a temperatura ambiente, la concentración de antocianos disminuyó, mientras que a temperaturas por encima de 45 °C aumentó dicha concentración. Este resultado se puede explicar por el doble efecto de los tratamientos por altas presiones, dado que por un lado, estos tratamientos reducen la actividad enzimática responsable de la degradación de las antocianinas, y por otro lado, mejoran la extractabilidad de estos compuestos dando lugar a zumos de granada presurizados con un mayor contenido en antocianinas que los zumos sin tratar (Ferrari *et al.*, 2010).

En general, los compuestos fenólicos son poco modificados por acción de las altas presiones. Cabe destacar que en muchos estudios han mostrado un aumento del contenido inicial de polifenoles totales (Keenan *et al.*, 2012) y de polifenoles individuales por acción de los tratamientos por altas presiones (Sánchez-Moreno *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2010; Plaza *et al.*, 2011).

Respecto al efecto de los tratamientos de altas presiones sobre los flavonoides, se ha observado que algunos de los flavonoles presentes en la cebolla como la quercetina, la quercetina-3-glucósido y la quercetina-3,4-diglucósido mostraron un aumento significativo de su concentración después de la presurización 100-400 MPa/5-50 °C/5 min en comparación con las cebollas no tratadas. Así, las cebollas sometidas a tratamientos de 100 MPa/5 °C/5 min y 100 MPa/50 °C/5 min mostraron un aumento de la concentración de

quercetina total del 26 % y del 18 %, respectivamente, en comparación con las muestras no tratadas. El aumento de la concentración de flavonoles después de la presurización se atribuyó a una mejor capacidad de extracción de estos compuestos de la matriz vegetal, mientras que la aplicación de temperaturas superiores a 30 °C en combinación con tratamientos por altas presiones > 100 MPa causaron una disminución de la concentración de flavonoles (Roldán-Marín *et al.*, 2009b).

En general, los componentes responsables del aroma natural de las frutas y las hortalizas no se ven alterados con el procesado con altas presiones, hecho que ha sido demostrado en numerosas ocasiones y en diversas matrices alimentarias. Del mismo modo, Butz *et al.* (1994) mostraron que la concentración global de compuestos aromáticos de las cebollas no sufría cambios después de la presurización a 300 MPa/25 °C/ 30 min.

Existen numerosos estudios publicados sobre el efecto de los tratamientos por altas presiones en otros compuestos bioactivos como el sulfurofano presente en vegetales del género *Brassica* como el brócoli. El sulfurofano es un isotiocianato que se forma a partir del glucosinolato conocido como glucorafanina por la acción del enzima mirosinasa, y que ha sido reconocido por sus importantes propiedades anticancerígenas. Así, tratamientos APH entre 0,1-600 MPa/75 °C/20-40 min mostraron un incremento significativo de los niveles de sulfurofano (Butz y Tauscher, 2000) por lo que los tratamientos de altas presiones pueden ser considerados como una herramienta útil para la funcionalización de alimentos vegetales. Otros estudios posteriores mostraron resultados similares. Así, Van Eylen *et al.*, (2009) observaron un aumento significativo de sulfurofano en cabezas florales de brócoli presurizadas entre 200-500 MPa/20-40 °C/15-35 min. Sin embargo, Houska *et al.* (2006) observaron que un zumo de brócoli presurizado a (500 MPa/25 °C/10 min) tenía un contenido en sulfurofano significativamente menor que las muestras sin presurizar.

3.3.2. Efecto de las altas presiones sobre la actividad antioxidante

El efecto de las altas presiones en la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos difiere en función de la matriz alimentaria. La actividad antioxidante medida con el ensayo DPPH[•] en zumo de naranja procesado a 350 MPa/30 °C/5 min presentaba menor actividad que las muestras sin tratar (De Ancos *et al.*, 2002). En el caso de los frutos de caqui, De Ancos *et al.* (2002) estudiaron la actividad antioxidante de purés de dos variedades de caqui Rojo Brillante y Sharon, y observaron que mientras que el puré de Rojo Brillante presentaba 8,5 veces mayor capacidad de secuestrar radicales libres que el puré de

Sharon, cuando estos dos purés fueron presurizados, la capacidad antioxidante de ambos purés fue similar.

En otros productos como un puré de moras se observó que tratamientos por altas presiones a 400 y 500 MPa/20 °C/15 min, no modificaron la actividad antioxidante del puré sin tratar. Sin embargo, el tratamiento a 600 MPa aumentó un 67 % la actividad antioxidante como resultado de la mejora en la extractabilidad de los antocianos por el efecto de las altas presiones (Patras *et al.*, 2009). Del mismo modo, se observó una mayor capacidad del secuestro del radical DPPH[•] en puré de tomate y zanahoria presurizado a 500-600 MPa/21 °C/15 min en comparación con las muestras no tratadas. Además, en el puré de zanahoria también se observó un incremento significativo en el contenido fenólico (Patras *et al.*, 2009).

El poder antioxidante total medido con el método FRAP en brócoli presurizado no se vio afectado por las altas presiones. Sin embargo, la capacidad antioxidante de zanahorias tratadas a 400 MPa por el método FRAP se redujo significativamente comparando con las zanahorias sin tratar, mientras que en judías verdes presurizadas a 400 y 600 MPa la capacidad antioxidante aumento significativamente, probablemente debido a un aumento en la concentración de luteína (McInerney *et al.*, 2007). En general, la capacidad antioxidante de los alimentos presurizados puede disminuir o verse incrementada dependiendo de la matriz estudiada y las variables del proceso utilizadas (presión/tiempo/temperatura). Además, estos cambios pueden ser relacionados con los cambios que sufren los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en cada alimento.

Si bien son abundantes los estudios científicos sobre la evaluación del efecto del procesado por altas presiones sobre nutrientes, compuestos bioactivos, actividad antioxidante (Oey *et al.*, 2008; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009; Barba *et al.*, 2012) y más recientemente sobre la bioaccesibilidad de los mismos a través de estudios de digestión gastrointestinal *in vitro* (Plaza *et al.*, 2011, 2012; Cilla *et al.*, 2012; Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2013); los estudios de la actividad biológica de dichos alimentos o ingredientes procesados por altas presiones son escasos.

4. Liofilización

4.1. Fundamento

La liofilización es un proceso de secado cuyo principio es la sublimación del hielo presente en la matriz alimentaria en condiciones de vacío; de esta forma, el hielo se sublima evitando el paso por la fase líquida. El cambio de fase de sólido a gas o sublimación debe realizarse en condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (punto en el que conviven los tres estados de la materia), puesto que por debajo de este no existe la fase líquida. La **Figura 11** representa la presión de saturación del agua en función de su temperatura, el punto triple se sitúa a la presión de 610 Pa (4,58 Torr = 4,58 mmHg) y a una temperatura de 0,01 °C. En otras palabras, la sublimación solo puede tener lugar a una temperatura inferior a 0 °C y a una presión inferior a 610 Pa (Clementz y Delmoro, 2011).

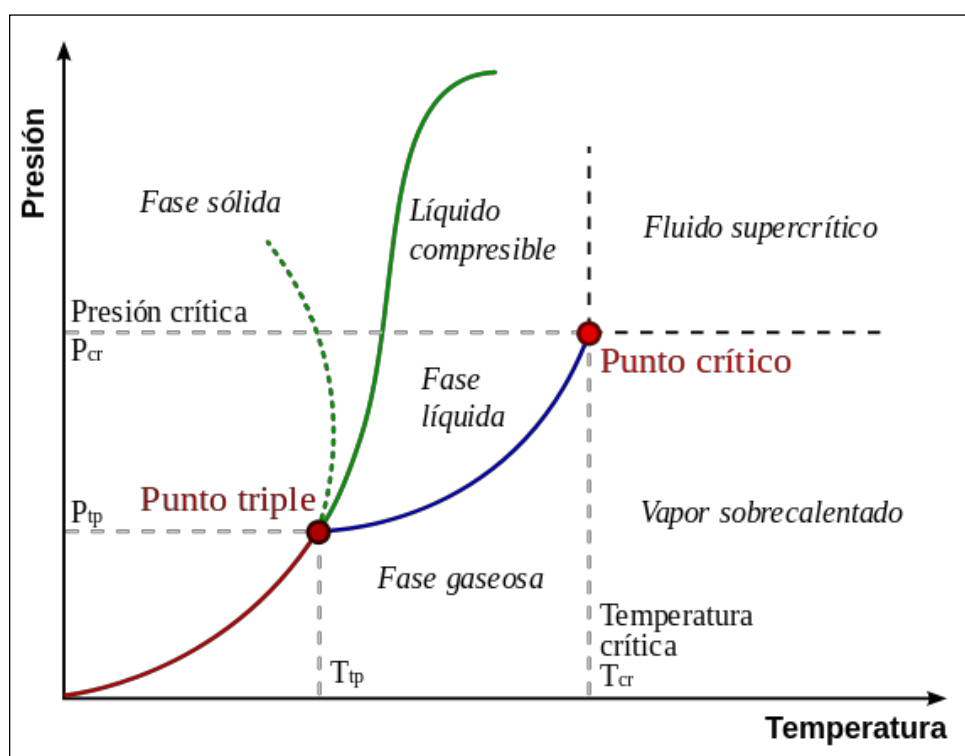


Figura 11. Presión de saturación del agua. La línea verde marca el punto de congelación, la azul el punto de ebullición y la roja el punto de sublimación. Se muestra la variación en función de la presión. El punto triple es el punto de unión entre las líneas verde, azul y rosa. La línea discontinua representa el comportamiento anómalo del agua.

Entre los procesos de secado, la liofilización es reconocida como el mejor proceso para mantener activos los compuestos bioactivos protectores de la salud y las características nutricionales de los productos vegetales (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011; Tseng y Zhao, 2012; Leong y Oey, 2012).

4.2. Etapas del proceso de liofilización

La liofilización consiste de cuatro etapas:

- 1) Preparación.
- 2) Congelación.
- 3) Sublimación o desecación primaria.
- 4) Desorción o desecación secundaria.

1) Preparación:

Previamente al tratamiento, es fundamental el acondicionamiento de la materia, dado que, una vez completado el proceso, los productos no pueden ser manipulados.

2) Congelación:

La congelación es una de las etapas principales en el proceso de liofilización, que tiene el objetivo de congelar el agua libre del producto. En matrices alimentarias debe realizarse una congelación rápida (temperaturas entre -50 y -80 °C). La temperatura de los alimentos desciende aproximadamente unos 20 °C en treinta minutos, dando lugar a la formación de cristales pequeños y evitando así la ruptura de la membrana o pared celular y de estructuras internas. Por el contrario, cuando la velocidad de congelación del agua es lenta, la temperatura deseada se alcanza entre 3 y 72 h, consecuentemente se forman cristales grandes que causan la ruptura de las estructuras celulares dañando a la célula. Así pues, el tamaño de los cristales define en cierta medida la apariencia del producto en seco: en el caso de la matriz con cristales pequeños, una vez seco presentará una apariencia mucho más clara que un producto el cual tenía cristales más grandes y que fue congelado lentamente (Xu *et al.*, 2009).

Para que el secado ocurra únicamente por sublimación, el producto congelado debe tener una estructura sólida.

3) Sublimación o desecación primaria:

Al comenzar el proceso, el hielo se sublima en la superficie del producto, penetra al interior dejando atrás una corteza porosa de material en seco por donde a su vez se transfiere el vapor generado durante la sublimación del hielo en las capas más internas. En esta etapa se diferencian tres fases, brevemente:

- a) Fase 1 o fase conductiva: se caracteriza por una máxima velocidad de sublimación hasta llegar a un máximo. El tiempo de esta fase es relativamente corto y es donde se lleva a cabo la mayor parte de extracción de agua del producto (entre un 75-90 %), siendo el mecanismo preponderante la transferencia de calor por conducción.
- b) Fase 2 o primera etapa difusiva: se caracteriza por un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que se produce el secado.
- c) Fase 3 o segunda etapa difusiva: la velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero, debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación. En esta etapa, dependiendo del material, es factible incrementar la temperatura de calefacción y del producto hasta valores en torno a 50 °C, puesto que la difusividad de los aromas disminuye sensiblemente cuando la humedad es pequeña.

4) Desorción o desecación secundaria:

La cuarta y última etapa del proceso de liofilización consiste en la desecación secundaria del producto por medio de la desorción. Se basa en evaporar el agua no congelable (o agua ligada) presente en los alimentos, alcanzando así un porcentaje de humedad final inferior al 2 %.

4.3. Efecto de la liofilización sobre compuestos bioactivos de vegetales

La liofilización constituye uno de los procesos más recomendados para el secado de material biológico ricos en compuestos sensibles al calor, como compuestos bioactivos, nutrientes y los compuestos volátiles (George y Datta, 2002; Dincer, 2003; Liu *et al.*, 2008; Shofian *et al.*, 2011).

A pesar de ser considerado uno de los métodos de secado más destacados en cuanto

a conservación de las características organolépticas y nutraceuticas en los alimentos (Nindo *et al.*, 2003; Argyropoulos *et al.*, 2011; Karam *et al.*, 2016), es un campo poco estudiado, especialmente en lo referente al efecto sobre compuestos bioactivos en matrices vegetales.

Los alimentos liofilizados se caracterizan por presentar unos valores más bajos de densidad aparente, una mayor porosidad y un deterioro mínimo del color (Ratti, 2001; Askari *et al.*, 2009; Witrowa-Rajchert y Rzaca, 2009; Russo *et al.*, 2013; Oikonomopoulou and Krokida, 2013; Nindo *et al.*, 2003; Argyropoulos *et al.*, 2011).

Los compuestos volátiles de las matrices vegetales liofilizadas presentan por un lado una mayor retención de dichos compuestos en comparación con otros sistemas de secado (Torres *et al.*, 2010; Krokida y Philippopoulos, 2006). Por otro lado, los compuestos volátiles se evaporan a mayor velocidad en las primeras fases de la liofilización que en las últimas fases (Krokida y Philippopoulos, 2006; Chin *et al.*, 2008; Mui *et al.*, 2002). Además, durante las fases avanzadas del proceso, la capa parcialmente seca de la matriz influye exponencialmente en la retención de compuestos por sorción o bloqueo (Krokida y Philippopoulos, 2006).

En cuanto a los polifenoles y la actividad antioxidante, al igual que los compuestos volátiles, la liofilización afecta en menor medida que otros métodos de secado por calor (Hsu *et al.*, 2003; Asami *et al.*, 2003; Nindo *et al.*, 2003; Kwok *et al.*, 2004; Bodo *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2006).

Según un estudio realizado por Pérez-Gregorio *et al.* (2011), donde estudiaban el efecto de la liofilización y el almacenamiento en el contenido de flavonoides de la cebolla roja, se observó que las cebollas sometidas a congelación mostraron niveles más bajos de flavonoles que el producto inicial; sin embargo, las muestras liofilizadas presentaron una mayor concentración de flavonoles, atribuyendo dicho incremento a la liberación de compuestos fenólicos de la matriz debido a la liofilización. Del mismo modo, investigaciones recientes donde evaluaban el efecto de diferentes métodos de secado en las propiedades antioxidantes en matrices vegetales, obtuvieron una mejor conservación, así como un aumento en el contenido de fenoles totales y de antocianinas en algunas muestras liofilizadas, concluyendo que el nivel y el incremento dependían fundamentalmente del tipo de matriz (arándanos, frambuesas, *Alpinia zerumbet* [jengibre] u hojas de *elator*), del sistema de producción y del cultivo (Chan *et al.*, 2009; Sablani *et al.*, 2011). Además, varios autores han encontrado pérdidas mínimas de compuestos bioactivos tales como flavonoles,

flavonas, catequinas y carotenoides en vegetales y frutas liofilizadas (Asami *et al.*, 2003; Zainol *et al.*, 2009; Abonyi *et al.*, 2002; Regier *et al.*, 2005; Shofian *et al.*, 2011). No obstante, en mango y sandía liofilizada la concentración de β -caroteno disminuyó un 26 y 43 %, respectivamente (Shofian *et al.*, 2011).

Acerca del efecto de la liofilización en la retención del ácido ascórbico, las investigaciones realizadas hasta el momento apuntan a una retención máxima, siendo en todos los casos superior al 60 % (Santos y Silva, 2008), tal es el caso de los tomates (Chang *et al.*, 2006), pimientos (Martínez *et al.*, 2005), algas (Chan *et al.*, 1997), fresas (Abonyi *et al.*, 2001), zanahoria (Lin *et al.*, 1998), espárragos (Nindo *et al.*, 2003), mango, fruta estrella (Carambola), sandía y melón (Shofian *et al.*, 2011).

Asimismo, en varios productos liofilizados la actividad antioxidante aumentó entre un 13 y un 82 % (Sablani *et al.*, 2011; Shofian *et al.*, 2011).

5. Alimentos funcionales

Diversos estudios epidemiológicos realizados durante las últimas décadas han reforzado la importancia de la dieta en la salud humana. Estos estudios demuestran que existe una relación significativa entre el tipo de alimento consumido, la composición de dichos alimentos y las cantidades consumidas del mismo con la mejora o el mantenimiento de un estado saludable del individuo. Gracias a estos estudios, hoy en día los alimentos se aprecian tanto por su valor nutritivo como por sus posibles efectos positivos en la prevención o protección contra enfermedades crónicas graves, especialmente las asociadas con el estilo de vida occidental (Ordovás *et al.*, 2007).

Los alimentos que presentan efectos beneficiosos para la salud humana genéricamente se denominan «alimentos funcionales». A pesar de ser un término utilizado con asiduidad, no existe una definición reconocida globalmente por los organismos reguladores (ILSI, 2009). No obstante, múltiples organizaciones pertenecientes a distintos países han formulado diferentes descripciones prácticas de alimento funcional.

1. Ministerio de Salud y Bienestar de Japón:

El término «alimento funcional» fue acuñado en Japón a principios de los años ochenta. En 1991, el Ministerio de dicho país fue el pionero, y actualmente el único, en publicar una reglamentación que regula la comercialización de algunos alimentos funcionales bajo la denominación de «alimentos para el uso específico en la salud» (Foods for specified health uses o FOSHU), refiriendo que dichos alimentos presentan componentes que desempeñan una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano. Los «alimentos para el uso específico en la salud» están destinados a ser consumidos para el mantenimiento y mejora de la salud o para usos especiales en condiciones concretas de salud, incluyendo la presión arterial y los niveles de colesterol en sangre.

2. Institute of Food Technologists (IFT):

Establece como «alimento funcional» aquellos alimentos y componentes de alimentos que proporcionan un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica (IFT, 2005).

3. Comisión Europea sobre la Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (FUFOSE):

Dicha comisión coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la vida (ILSI) define «alimento funcional» como aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable. Los alimentos funcionales no dejan de ser alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideren normales para su consumo en la dieta: no se trata de pastillas o píldoras, sino que forman parte de los hábitos alimenticios normales. Un alimento funcional puede ser un alimento natural o un alimento en el que un componente haya sido añadido/retirado tecnológicamente o biotecnológicamente. También puede ser un alimento en el que la naturaleza o biodisponibilidad de uno o más de sus componentes haya sido modificada, o cualquier combinación de estas posibilidades. Un alimento funcional puede serlo para todos los miembros de una población o para un grupo específico, que puede estar definido, por ejemplo, por su edad o constitución genética (Kwak *et al.*, 2001).

4. Academia de Nutrición y Dietética (AND):

El término «alimentos funcionales» engloba tanto a los alimentos enteros como a los enriquecidos o mejorados que tienen un efecto potencialmente beneficioso y efectivo sobre la salud cuando se consumen dentro de una dieta variada de forma regular.

5.1. Clasificación de los alimentos funcionales

Los científicos que participaron en la FUFOSE propusieron que la ciencia de la alimentación funcional debería estructurarse en áreas relativas a las funciones que pueden mejorarse con los alimentos funcionales. El proyecto Process of the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods (PASSCLAIM) identificó y propuso siete áreas temáticas en las que la alimentación funcional puede demostrar efectos relevantes (Agget *et al.*, 2005):

1. Patología cardiovascular relacionada con la dieta.
2. Salud ósea y osteoporosis.
3. Rendimiento y forma física.

4. Regulación del peso corporal, sensibilidad a la insulina y diabetes.
5. Cáncer relacionado con la dieta.
6. Estado mental y rendimiento psíquico.
7. Salud gastrointestinal e inmunidad.

Existen otras clasificaciones para este tipo de alimentos como la que se muestra a continuación donde se divide en cuatro categorías diferentes:

- a) Alimentos convencionales que contienen compuestos bioactivos: donde se incluyen la mayoría de vegetales, frutas, granos, lácteos, pescados y carnes.
- b) Alimentos mejorados: aquellos que han sido enriquecidos, fortificados o mejorados con nutrientes u otros ingredientes beneficiosos para la salud, por ejemplo: huevos con mayor contenido de ácidos grasos ω -3.
- c) Alimentos medicinales: alimentos que se han formulado o procesado para usos dietéticos específicos destinados a pacientes con alguna enfermedad o afección y solo deben usarse bajo supervisión médica. En este grupo se incluyen fórmulas especializadas diseñadas para personas con problemas de salud determinados.
- d) Alimentos para usos dietéticos específicos: son parecidos a los alimentos medicinales, pero con la peculiaridad de que están disponibles comercialmente y que no requieren de supervisión médica. Estos alimentos satisfacen necesidades dietéticas especiales que se deben a condiciones de salud específicas, como enfermedad celíaca e intolerancia a la lactosa.

Por otro lado, los japoneses clasifican los alimentos funcionales en tres categorías:

- a) Alimentos a base de ingredientes naturales.
- b) Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.
- c) Alimentos que al ser consumidos cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano, en particular: mejora de los mecanismos de defensa biológica, prevención o recuperación de alguna enfermedad específica, control de las condiciones físicas y mentales y retraso en el proceso de envejecimiento.

5.2. Mercado de los alimentos funcionales

Puesto que no existe un consenso global respecto a la definición de alimentos funcionales, la estimación del tamaño del mercado es compleja (Calvo *et al.*, 2016).

El mercado de alimentos funcionales experimentó un incremento global del 26,7 % entre el año 2009 y 2013 (Leatherhead Food Research, 2014). El gran interés por parte del consumidor en la prevención de la salud, así como el aumento constante de la esperanza de vida y el deseo de mejorar la calidad de vida (Bibliardi y Galati, 2013), son factores clave que impulsan al consumidor a comprar este tipo de alimentos, lo que provoca un aumento de su demanda. Se especula que el mercado mundial de alimentos funcionales podría llegar a superar los 304,4 billones de dólares para el 2020.

Estados Unidos y Japón son los principales mercados de alimentos funcionales en el mundo, seguidos por Asia-Pacífico y Europa. Los mercados Europeos más representativos son Reino Unido, Francia, Alemania, España e Italia, abarcando un 16 % del valor del mercado mundial (**Figura 12**).

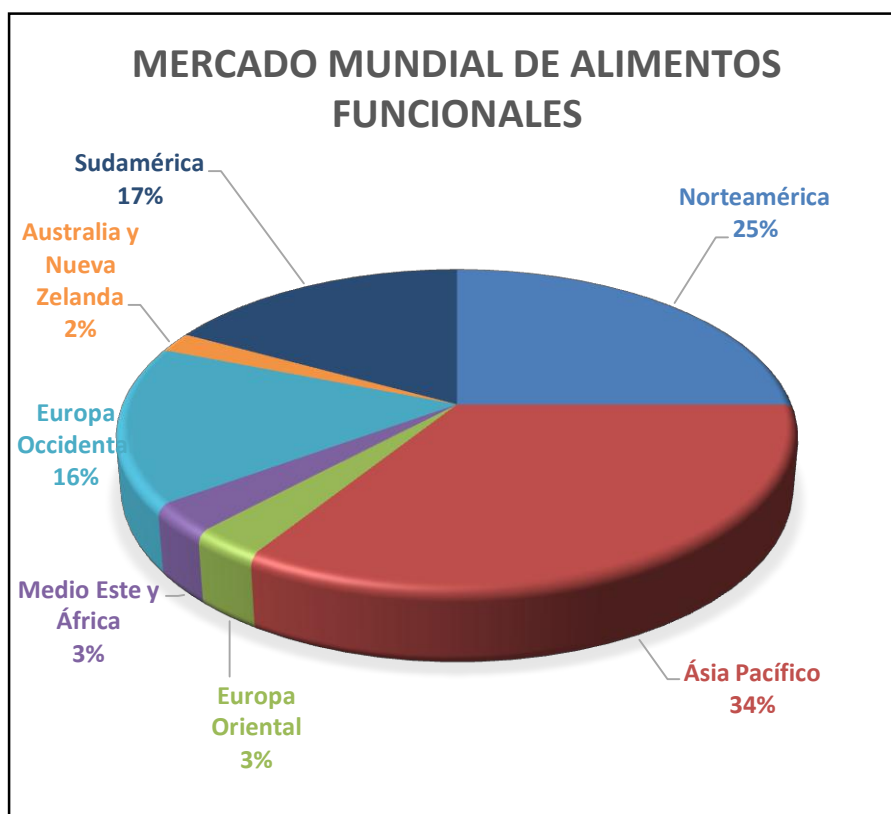


Figura 12. Mercado mundial de alimentos funcionales. Fuente: Euromintor (2013)

El mercado español de alimentos funcionales representa un 11 % del mercado europeo, siendo los más característicos los lácteos y los zumos enriquecidos con calcio o ciertas vitaminas, seguido por cereales fortificados con hierro y fibra y, en menor medida, las margarinas enriquecidas con fitoesteroles.

Los principales constituyentes fitoquímicos de interés que forman parte de los alimentos funcionales se pueden agrupar en los siguientes grupos: polifenoles, terpenoides o compuestos sulfurados. De todos ellos, solo las isoflavonas de la soja y los fitoesteroles están siendo actualmente empleados en la elaboración de alimentos funcionales comercializados en España. En la actualidad existen numerosos extractos de vegetales ricos en compuestos fitoquímicos o dichos compuestos aislados que son comercializados como suplementos o productos dietéticos, dentro de lo que se consideraría nutracéuticos, y que en un futuro próximo pueden ser susceptibles de ser utilizados como ingredientes funcionales.

En este sentido, es de gran importancia evaluar el efecto del procesado por altas presiones y la liofilización sobre los compuestos bioactivos responsables de la actividad biológica en matrices vegetales, desde el punto de vista de la posible modificación de la funcionalidad de sus ingredientes, obteniendo así posibles ingredientes o alimentos funcionales de origen vegetal.

6. Actividad biológica de alimentos vegetales funcionales *in vivo*

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que muestran que las dietas ricas en frutas y verduras pueden reducir la incidencia de patologías cardiovasculares, diabetes o cáncer, siendo estos efectos atribuidos a los compuestos bioactivos presentes en los vegetales. La mayor parte de las evidencias científicas se basan en experimentos *in vitro* que son difícilmente extrapolables. En los últimos años, numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de dichos compuestos mediante estudios experimentales *in vivo*, tanto en animales como en humanos. En las siguientes tablas se describen los estudios *in vivo* sobre la bioactividad de algunos vegetales (**Tabla 3**) y la bioactividad de las especies del género *Allium* (**Tabla 4**).

Tabla 3. Estudios in vivo sobre la actividad biológica de matrices vegetales

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Alcachofa (<i>Cyanara scolymus</i>)			
Extracto acuoso de alcachofa	Ratas hipercolesterolémicas	Efecto hipocolesterolémico y antiaterogénico	Mocelin <i>et al.</i> , 2016
Alcachofa	Ratas sanas	Mejora la actividad antioxidante	Jiménez-Escrig <i>et al.</i> , 2003
Extracto de hojas de alcachofa	Ratas sana	Aumento de la secreción de bilis	Saénz <i>et al.</i> , 2002
Extracto de alcachofa	Ratas con lesión hepática inducida	Efecto hepatoprotector	Mehmetçik <i>et al.</i> , 2008
Alcachofa	Ratas hipercolesterolémicas	Mejora la actividad antioxidante y el perfil lipídico	Heidarian <i>et al.</i> , 2011
Berenjena (<i>Solanum melongena</i>)			
Extracto de berenjena	Ratas hipertensas	Efecto antihipertensivo Mejora de la función vascular	Simões <i>et al.</i> , 2016
Boniato (<i>Ipomoea batatas</i>)			
Boniato	Ratas con resistencia a la insulina	Mejora la sensibilidad a la insulina	Chen <i>et al.</i> , 2013
Boniato	Humanos con diabetes tipo 2	Mejora la sensibilidad a la insulina	Ludvik <i>et al.</i> , 2003
Brócoli (<i>Brassica oleracea itálica</i>)			
Familia de las crucíferas	Humanos con cáncer	Efecto favorable en gran variedad de cánceres	Bosetti <i>et al.</i> , 2012.
Brócoli	Humanos con cáncer	Reducción del riesgo de cáncer de prostata	Joseph <i>et al.</i> , 2004

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Brócoli	Humanos con cáncer	Mejora del cáncer colorectal	Lin <i>et al.</i> , 1998
Brócoli	Humanos con cáncer	Reducción del riesgo de cáncer de pulmón	Brennan <i>et al.</i> , 2005
Brócoli	Ratas sanas	Efecto cardioprotector	Mukherjee <i>et al.</i> , 2012
Brotes de brócoli	Hámsters sirios hipercolesterolémicos	Efecto hipocolesterolémico	Rodríguez-Cantú <i>et al.</i> , 2011
Brotes de brócoli	Humanos sanos	Mejora el metabolismo del colesterol y reduce los marcadores de estrés oxidativo	Murashima <i>et al.</i> , 2004.
Calabaza (<i>Curcubita moschata</i>)			
Calabaza	Ratas diabéticas	Efecto hipoglicémico	Chang <i>et al.</i> , 2014
Col (<i>Brassica oleracea capitata</i>)			
Extracto de col lombarda	Ratas hipercolesterolémicas	Efecto hipolipidémico, hipocolesterolémico, hepatoprotector y cardioprotector	Sankhari <i>et al.</i> , 2012
Espárragos (<i>Asparagus officinalis L</i>)			
Espárragos (parte inferior tallo)	Humanos sanos	Modulación de la hipertensión, hiperglicemia y dislipidemia	Nishimura <i>et al.</i> , 2013
Espinacas (<i>Spinacia oleracea</i>)			
Extracto de espinaca	Ratas con necrosis miocárdica	Efecto antiinflamatorio, antiaterogénico y antiapoptótico	Vutharadhi <i>et al.</i> , 2017
Espinacas	Ratas intoxicadas con CCl ₄	Efecto hepatoprotector	Jain <i>et al.</i> , 2012
Espinacas	Ratas Sprague-Dawley hiperlipidémicas	Efecto antioxidante	Ko <i>et al.</i> , 2014

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Espinaca	Ratones BALB/c	Efecto anti-cáncer	Maeda <i>et al.</i> , 2012
Polvo de tilacoides procedente de hojas de espinacas	Cerdos obesos	Efecto hipoglucémico	Montelius <i>et al.</i> , 2014
Extracto de espinacas	Ratones deficientes de apoE ^{-/-}	Efecto lipolipemiante	Könkhe <i>et al.</i> , 2009
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)			
Lechuga	Ratas obesas	Mejora de los niveles de colesterol y de lípidos en plasma Mejora de la actividad antioxidante	Lee <i>et al.</i> , 2009
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)			
Extracto de piel de patata	Ratas hipercolesterolémicas	Efecto hepatoprotector y efecto antioxidante	Hsieh <i>et al.</i> , 2016
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)			
Extracto de tomate verde	Ratones C57BL/6 obesos	Efecto antiobesidad asociado con la activación de la vía AMPK	Choi <i>et al.</i> , 2013
Tomate	Ratas Sprague-Dawley	Efecto hipocolesterolémico	Navarro-González <i>et al.</i> , 2014
Zumo de tomate	Humanos sanos	Efecto hipocolesterolémico	Jacob <i>et al.</i> , 2008
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)			
Extracto de zanahoria	Ratas Wistar, inducción estrés oxidativo con tioacetamida	Efecto hepatoprotector	Singh <i>et al.</i> , 2012
Zanahoria	Ratas, inducción lesión hepática y estrés oxidativo inducido	Efecto hepatoprotector	Ebeid <i>et al.</i> , 2015

Tabla 4. Estudios in vivo sobre la actividad biológica del género *Allium*

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Especie</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas hipercolesterolémicas	Mejora la hipercolesterolemia y sus complicaciones mediante la regulación de vías metabólicas alteradas	González-Peña <i>et al.</i> , 2015
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas hipercolesterolémicas	Modulación parcial de la disfunción vascular Reducción de los índices de riesgo vinculados a estadios iniciales de aterosclerosis	González-Peña <i>et al.</i> , 2014
Cebolla y ajo	<i>Allium cepa</i> y <i>Allium sativum</i>	Ratas obesas	Mejora actividad del sistema antioxidante Disminución intolerancia glucosa Disminución oxidación colesterol LDL Disminución del estrés oxidativo	Souza <i>et al.</i> , 2011
Extracto de cebolla	<i>Allium cepa</i>	Conejos diabéticos	Reducción del daño hepático, Reducción de los niveles de glucosa Reducción de la peroxidación lipídica	Ogunmodede <i>et al.</i> , 2012
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas con carcinogénesis hepática	Actividad antitumoral	Bang <i>et al.</i> , 2010
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Humanos	Reducción del riesgo de cáncer gástrico	Zhou <i>et al.</i> , 2011
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Humanos con cáncer	Efecto protector en cáncer de intestino grueso	Galeone <i>et al.</i> , 2006
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Humanos con cáncer	Efecto protector en cáncer de esófago	Chen <i>et al.</i> , 2009
Cebolla, ajo y puerro	<i>Allium cepa</i> , <i>Allium sativum</i> y <i>Allium ampeloprasum</i>	Humanos con cáncer	Efecto protector cáncer de próstata	Hsing <i>et al.</i> , 2002
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Humanos con cáncer	Efecto protector en cáncer bucal, de laringe y de ovarios	Galeone <i>et al.</i> , 2009

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Especie</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Humanos con cáncer	Efecto protector en cáncer de pulmón	Le Marchand <i>et al.</i> , 2000
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Ratas hipertensas Ratas con daño miocárdico	Reducción del peso, presión sanguínea, colesterol, triglicéridos y glucosa en sangre	Asdaq <i>et al.</i> , 2011
Cebolla y ajo	<i>Allium cepa</i> y <i>Allium sativum</i>	Humanos con cáncer	Reducción del riesgo de adenoma colorrectal	Millen <i>et al.</i> , 2007
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas con carcinoma hepatocelular	Actividad antitumoral, suprime la formación de focos preneoplásicos	Bang and Kim, 2010
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas diabéticas	Reducción de los niveles de glucosa en sangre, niveles lipídicos y reducción del estrés oxidativo renal	Bang <i>et al.</i> , 2009
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Cerdos sanos	Normalización de los niveles lipídicos y propiedades inmunoestimulantes	Ostrowska <i>et al.</i> , 2004
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Cerdos dieta rica en grasas	Mejora del estado oxidativo en el suero	Gabler <i>et al.</i> , 2006
Subproducto de cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas sanas	Modulación de los niveles lipídicos y de las lipoproteínas	Roldan-Marín <i>et al.</i> , 2010
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas hipercolesterolémicas	Disminución de los niveles de colesterol	Kumari & Augusti, 2007
Subproducto de cebolla	<i>Allium cepa</i>	Hombres fumadores sanos	Mejora del perfil lipídico, niveles de glucosa en sangre y de la presión sanguínea	Lee <i>et al.</i> , 2011
Cebolla y ajo	<i>Allium cepa</i> y <i>Allium sativum</i>	Ratas diabéticas	Efecto antioxidante y antihiper glucémico	El-Demerdash <i>et al.</i> , 2005
Extracto de piel de cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas diabéticas	Mejora la hiperglucemia y la resistencia a la insulina	Jung <i>et al.</i> , 2011

<i>Matriz Vegetal</i>	<i>Especie</i>	<i>Modelo animal/humano</i>	<i>Efecto demostrado</i>	<i>Referencia</i>
Subproducto de cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ratas sanas	Efecto prebiótico	Roldán-Marín <i>et al.</i> , 2009
Extracto de piel de cebolla rico en quercetina	<i>Allium cepa</i>	Ratas obesas	Efecto antiobesidad	Moon <i>et al.</i> , 2013

La mayoría de los estudios sobre la potencial actividad biológica de la cebolla se han centrado en sus propiedades anticancerígenas, efectos en el metabolismo lipídico, efectos cardiovasculares, efectos en el sistema respiratorio, actividad antibiótica y propiedades antioxidantes. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que pongan de manifiesto la actividad biológica *in vivo* de la cebolla procesada por alta presión hidrostática y liofilizada como posible ingrediente funcional.

En este sentido, en esta Tesis Doctoral se plantea poner de manifiesto las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas *in vitro* e *in vivo* de la cebolla procesada por alta presión hidrostática y liofilizada en un modelo animal, que permita dilucidar el papel protector de la cebolla frente a la aterosclerosis como posible ingrediente funcional en la prevención cardiovascular.

2. Objetivos

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto de la alta presión hidrostática (APH) y la liofilización sobre los compuestos bioactivos responsables de la actividad biológica de la cebolla, así como, poner de manifiesto las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de la cebolla como ingrediente funcional en la prevención cardiovascular a través de estudios *in vitro*, y en un modelo animal de hipercolesterolemia inducida por la dieta.

Para alcanzar este objetivo general se desarrollaron varios **objetivos parciales**:

1. Caracterización cuali- y cuantitativa de los constituyentes bioactivos (compuestos organosulfurados, flavonoles, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C) de cebolla procesada por alta presión hidrostática y liofilizada.
 - 1.1 Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C.
 - 1.2 Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de compuestos volátiles, entre ellos polisulfuros.
 - 1.3 Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de flavonoles.
2. Determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de extractos de cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización.
3. Evaluación de los efectos de la cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización como ingrediente funcional en la actividad antiinflamatoria, antioxidante e hipolipidémica, los biomarcadores de riesgo cardiovascular y el perfil de ácidos grasos en ratas Wistar hipercolesterolémicas.

3. Materiales y Métodos

La metodología y los materiales y métodos empleados en los diversos trabajos experimentales se describen detalladamente en los apartados *Materiales y métodos* de los artículos indexados. La finalidad de esta sección es reforzar su comprensión.

3.1. Preparación de las muestras de cebolla

Para los ensayos *in vitro*, las cebollas utilizadas (*Allium cepa* L. var *cepa*, ‘Recas’) se cosecharon en Enero de 2011 en España y fueron suministradas por Cebacat (Asociación Catalana de Productores - Comercializadores de Cebolla, Lleida, España). Los bulbos estuvieron libres de daños externos y fueron almacenados a 4 °C hasta su procesado.

La preparación de las cebollas para el posterior tratamiento con altas presiones consistió en eliminar las dos primeras capas externas a mano, cortar los bulbos en cubos de 10 mm y envasarlas en bolsas tipo Doypack® (Polyskin XL, Amcor Flexibles Hispania, S.L., Granollers, Barcelona, España) de muy baja permeabilidad a los gases.

Las muestras de cebolla fueron tratadas con altas presiones en una unidad de presión hidrostática. La capacidad de la vasija fue de 2,900 mL, con una presión máxima de 900 MPa y un potencial máximo de temperatura de 100 °C (High Pressure Iso-Lab System, Model FPG 7100:912C, Stansted Fluid Power LTD, Essex, UK). La velocidad de compresión y descompresión fue de 3 MPa/s.

Se realizaron diferentes tratamientos de alta presión hidrostática (APH) [T0: cebolla sin tratar; T1: 200 MPa/25 °C/5 min; T2: 400 MPa/25 °C/5 min; T3: 600 MPa/25 °C/5 min], con la finalidad de seleccionar las condiciones más apropiadas para los ensayos *in vivo*. Después del tratamiento, las muestras fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido (en adelante, cebolla troceada, CT). Posteriormente, parte de la CT fue liofilizada en un liofilizador (Modelo Lyoalfa, Telstar, S.A., Barcelona, España) y pulverizada con un mortero hasta obtener un polvo fino (en adelante, cebolla pulverizada, CP), para evaluar la influencia de la liofilización y la pulverización. (**Artículos 1, 2 y 3**). En la **Figura 13** se muestra un esquema del proceso de preparación de las muestras de cebolla.

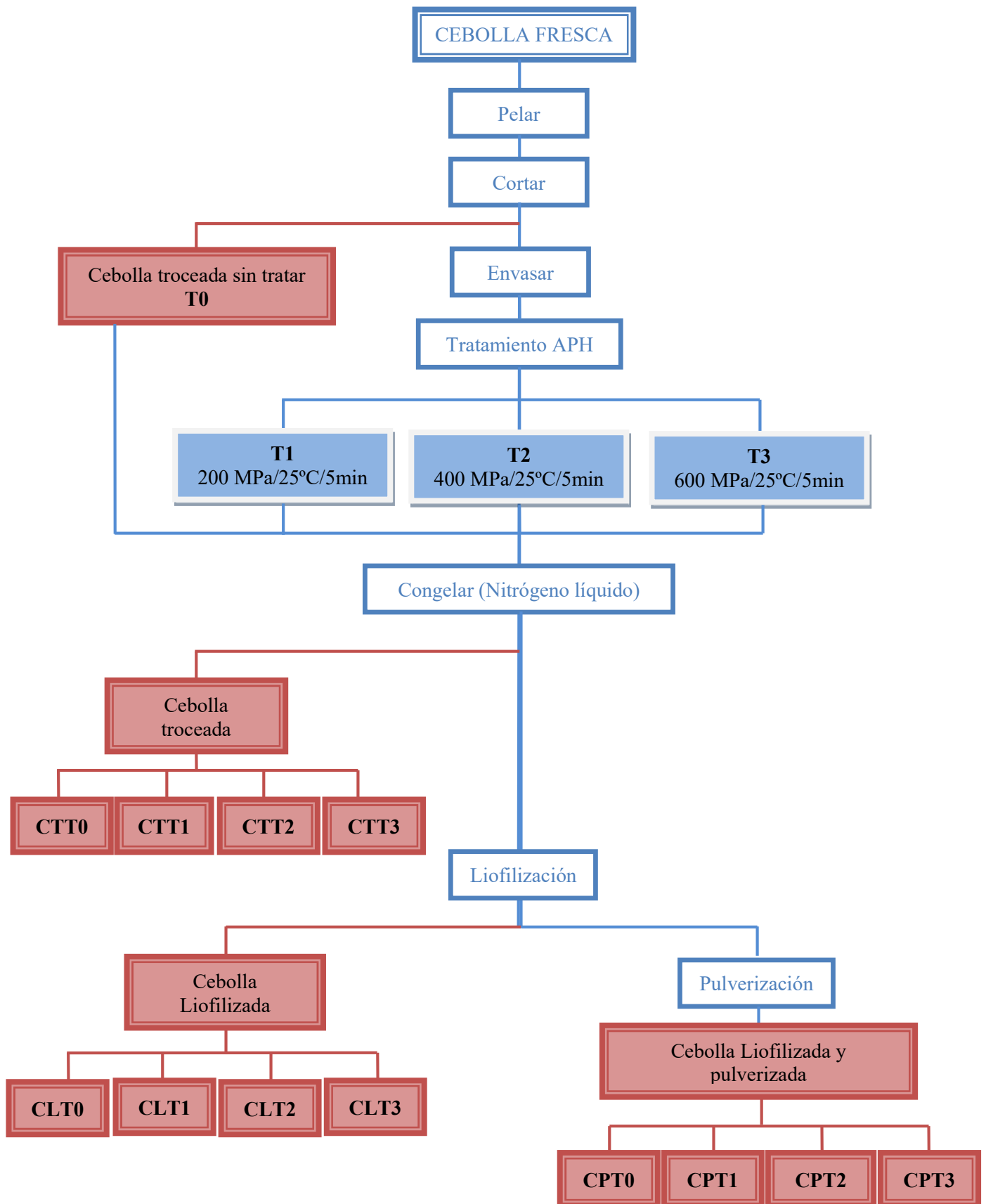


Figura 13. Esquema de la preparación de las muestras de cebolla.

Para los ensayos *in vivo* las cebollas crudas (*Allium cepa* L. var *cepa*, ‘Recas’) se cosecharon en Abril de 2012 en España, y fueron suministradas por Cebacat (Asociación Catalana de Productores - Comercializadores de Cebolla, Lleida, España). Los bulbos libres de daños externos fueron almacenados a 4 °C hasta su procesado (5 días después). La preparación de las muestras para su posterior tratamiento con altas presiones fue idéntica que la aplicada en las muestras para los ensayos *in vitro*. Las muestras de cebolla fueron sometidas a un tratamiento con altas presiones de 400 MPa, durante 5 min y a una temperatura de 25 °C. Después del tratamiento, las cebollas fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas en un liofilizador, pulverizadas con una ultra centrífuga molino ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) obteniendo un polvo fino (tamaño final de partícula $\leq 250 \mu\text{m}$) y almacenadas a $-20 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ hasta su utilización (**Artículos 4 y 5**).

3.2. Composición nutricional de la cebolla procesada

3.2.1. *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos

El *S*-Butil-L-cisteína sulfóxido (BCSO) se utilizó como patrón interno para el análisis de *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos (ACSOs). Se preparó siguiendo el procedimiento descrito por Tsuge *et al.* (2002) y se obtuvo a partir de L-cisteína por alquilación de azufre seguido de una oxidación del átomo de sulfuro. La determinación de ACSOs se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo la metodología descrita por Mallor y Thomas (2008) con alguna modificación. Para la determinación de ACSOs se preparó una solución de metanol/cloroformo/agua (12:5:3, v/v/v), se añadieron 20 mL de dicha solución extractante a 2 g de cebolla troceada y a 0,2 g de cebolla pulverizada y se mantuvo durante toda la noche a -20 °C . Se añadió el BCSO (20 mg/mL) como patrón interno. Una vez mezclado, las fases se separaron por centrifugación a $12000 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. La fase superior se concentró hasta 3 mL en un rotavapor a 30 °C y el extracto se resuspendió en 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,03 M. Las impurezas de la solución se eliminaron filtrando a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y los extractos se analizaron por duplicado por HPLC (**Artículos 1, 4 y 5**).

El sistema cromatográfico empleado fue un Hewlett Packard series 1100 equipado con un degasificador en línea, una bomba cuaternaria, un inyector automático termostatzado, un horno para columna y un detector de diodos UV-visible. La columna

utilizada fue una C18 Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 μ m) (Technokroma, Barcelona, Spain). La separación se realizó en una única etapa con elución isocrática de 30 min, empleando como fase móvil ácido clorhídrico (HCl) 0,03 M con un flujo de 0,6 mL/min. La detección se realizó con un detector de diodos con una longitud de onda de 215 nm.

La identificación de los ACSOs en las muestras se realizó por coincidencia con los respectivos tiempos de retención y las características cromatográficas de los patrones estándar y en comparación con la bibliografía. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de BCSO por 100 g de peso fresco (pf).

3.2.2. Ácidos orgánicos

Para la determinación de los ácidos orgánicos y azúcares se pesaron aproximadamente 1 g de muestra de cebolla troceada y 0,1 g de muestra de cebolla pulverizada. Cada una de las muestras pesadas se mezclaron con 7 mL de agua desionizada y se trituraron con un homogenizador de tejidos de alta velocidad (Omnimixer, modelo ES-207, Omni Internacional Inc., Gainesville, VA. USA) a 8000 rpm durante 40 s. Posteriormente la mezcla se centrifugó (17000 \times g a 4 °C durante 5 min) y 1,5 mL de la fase superior de muestra se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m.

Los análisis de ácidos orgánicos se realizaron mediante un cromatógrafo iónico (Metrohm 861 Advanced Compact IC) acoplado a un procesador de muestra 838 Advanced IC con una unidad de válvula 812 y un volumen de 20 μ L del bucle de inyección de muestra, equipado con una bomba 818 IC, un desgasificador de eluyente, una unidad de tratamiento (bomba peristáltica de doble canal) de la muestra con un filtro de 0,45 μ m y un detector de conductividad de alto rendimiento (819 IC). La columna utilizada para la separación fue Metrosep ASupp 5-250/4,0 (250 x 4 mm, tamaño de partícula 5 μ m), cuyo material de relleno era alcohol polivinílico con grupos de amonio cuaternario y a una temperatura de 32 °C. La fase móvil fue ácido tetraoxoclórico (HCl₄) 0,5 mM con un flujo de 0,50 mL/min. Con el fin de ajustar la línea base a 15 μ S/cm para la supresión química automática se utilizaron 50 mM de tricloruro de litio y agua ultrapura (Milli-Q).

La identificación de los ácidos orgánicos en las muestras se realizó por coincidencia con los respectivos tiempos de retención de los patrones estándares comerciales y la cuantificación de cada uno de los ácidos orgánicos se obtuvo a través de las áreas de los picos cromatográficos.

3.2.3. Azúcares

La preparación de las muestras fue la misma que para la determinación de los ácidos orgánicos.

Los azúcares fueron identificados y cuantificados por cromatografía iónica utilizando un cromatógrafo iónico 817 Bioscan (Metrohm AG, Herisau, Suiza). La columna utilizada fue Hamilton RCX-30 (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula 7 µm). Las fases móviles fueron agua Milli-Q e hidróxido de sodio (NaOH) 150 mM, con un flujo de 1 mL/min, temperatura 32 °C, se utilizó un detector amperométrico donde se registró la señal obtenida respecto al tiempo de retención.

La cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa se realizó a partir del área relativa del pico cromatográfico correspondiente al patrón externo y en comparación con la bibliografía (**Artículos 1, 4 y 5**).

3.2.4. Proteínas

La determinación de las proteínas se realizó de acuerdo al método de combustión Dumas siguiendo el método descrito por la AOAC (1995). Para obtener el contenido de proteína, se multiplicó el contenido de nitrógeno por 6,25 y los resultados se expresaron como g de proteína por 100 g de pf (**Artículos 1, 4 y 5**).

3.2.5. Cenizas

El contenido de cenizas se determinó siguiendo el método descrito por la AOAC (AOAC, 1995). Las muestras de cebolla se introdujeron en un horno de mufla a una temperatura de 550 °C hasta obtener cenizas blancas. Los resultados se expresaron como g de cenizas por 100 g de pf (**Artículos 1, 4 y 5**).

3.2.6. Minerales

Previo a la identificación y cuantificación de los minerales en las muestras de cebolla, las muestras fueron digeridas por triplicado con un digestor de microondas Labstation (Milestone, model ETHOS 1, Milestone Inc., Shelton, Germany). A partir de la solución obtenida y mediante un espectrómetro de absorción atómica PekinElmer (Norwalk, CT, USA) 5100 se determinaron los diferentes minerales – calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), magnesio (Mg), fósforo (P), potasio (K), selenio (Se), sodio (Na) y zinc (Zn) – con llama aire/acetileno sin lámpara para K; y con llama aire/acetileno

utilizando una lámpara de cátodo hueco para la determinación de Na, Fe, Co y Mn. Se y P fueron determinados por espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo utilizando Perkin Elmer (Nowalk, Connecticut, USA) Optima 4300 DV. Los resultados se expresaron en mg de mineral por 100 g de pf, a excepción del Se que se expresó en µg de Se por 100 g de pf (**Artículo 1**).

3.2.7. Ácido ascórbico y vitamina C total

El ácido ascórbico y la vitamina C se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El procedimiento utilizado para la determinación de vitamina C fue la reducción de ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico, utilizando el ditiotreitól (DTT) como agente reductor.

Para la extracción se pesaron 7,5 g de muestra y se homogeneizaron con 20 mL de solución extractante (3 % ácido metafosfórico + 8 % ácido acético) en el homogenizador Omnimixer Omni Internacional, con baño exterior de hielo, durante 4,5 min a 7500 rpm (3 x 1,5 mm). La mezcla obtenida se centrifugó a 14636 g, durante 10 min y a una temperatura de 5° C, y se reajustó el volumen a 50 mL con agua destilada en un matraz aforado. Las muestras se filtraron a través de un filtro de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm, y 20 µL de cada muestra se inyectaron por duplicado en el sistema cromatográfico. Para determinar el contenido de ácido ascórbico se hizo reaccionar una alícuota de 0,5 mL de la solución con 3 mL de una solución de DTT (20 mg/mL) durante 2 h – tiempo durante el cual se produce la reducción de ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico – a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se filtró la muestra a través de un filtro de celulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm. Para la determinación de vitamina C (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) se inyectaron 20 µL de cada muestra en el sistema cromatográfico.

El sistema cromatográfico empleado fue un cromatógrafo Hewlett Packard series 1100 equipado con un desgasificador en línea, una bomba cuaternaria, un inyector automático termostatzado, un horno para columna y un detector de diodos UV-visible, sistema controlado por el software Chemstation. La columna utilizada fue una C18 Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Technokroma, Barcelona, Spain). La separación se realizó en una única etapa con elución isocrática de 15 min, empleando como fase móvil ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 0,01 % (pH 2,5 – 2,6) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó en un detector de diodos con una longitud de onda de 245 nm.

La identificación del ácido ascórbico se realizó teniendo en cuenta su comportamiento cromatográfico, por comparación de su tiempo de retención y su espectro de absorción en UV/visible con el patrón comercial y los datos disponibles en la bibliografía.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del patrón externo, a partir de una recta de calibrado de cinco niveles de concentración del ácido ascórbico (**Artículos 1, 4 y 5**).

3.3. Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de la cebolla

3.3.1. GC-MS mediante la técnica de espacio de cabeza

La determinación de los compuestos volátiles de las diferentes muestras de cebolla se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC- MS), en modo de barrido completo (SCAN) para la identificación de los compuestos volátiles. Con el fin de cuantificar los compuestos seleccionados con una mayor sensibilidad en comparación con el modo SCAN, se operó en el modo de monitorización del ión seleccionado (SIM).

3.3.1.1. *Identificación*

La identificación de los compuestos detectados en modo SCAN se llevó a cabo por inyección de patrones estándar, por comparación de espectros utilizando la biblioteca de espectros de masas Registros Wiley 7ª edición y la librería de espectros del National Institute Standard and Technology (NIST) y también mediante el cálculo de los índices de la retención lineal en relación con una serie de alcanos (C6 - C20). Para el método del cálculo semicuantitativo, la abundancia de cada compuesto fue dividida por la abundancia del patrón interno sulfuro de alilo y metilo.

3.3.1.2. *Cuantificación*

Con el fin de cuantificar compuestos específicos con una mayor sensibilidad respecto al modo SCAN, el espectrómetro de masas se operó en modo SIM. Para desarrollar el método SIM primero se obtuvieron escaneos completos de todos los compuestos y luego se dividieron en función de sus tiempos de retención los 10 compuestos seleccionados (9 blancos y un patrón interno) en 4 grupos con 5-9 iones por grupo. Para cada compuesto se seleccionaron los tres productos iónicos más abundantes; el producto iónico más abundante se escogió como ión cuantificador y como iones cualificadores se utilizaron los otros 2

iones más abundantes. La cuantificación se realizó por triple inyección.

Los parámetros evaluados en la técnica de validación del método fueron: exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, pendiente y valores de intersección.

Para la preparación de las soluciones de los patrones estándar externos se prepararon 3 soluciones stock madres, todas ellas en agua ultrapura:

- La solución stock primaria A se utilizó para los siguientes patrones: propionaldehído, 1-propanotiol y dipropil disulfuro (20000 µg/mL).
- La solución stock primaria B se utilizó para: 2-metil-2-pentenal, tioacetato de propilo, dimetil trisulfuro, dipropil disulfuro y metil propil trisulfuro (10000 µg/mL).
- La solución stock primaria C para el hexanal (1602 µg/mL).

Las soluciones stock se prepararon en botellas de vidrio oscuro y se almacenaron a - 20 °C. Se hicieron curvas de calibración con 5 niveles de concentración.

La determinación de la pendiente, los valores de intersección y la desviación estándar se realizó a partir de análisis de regresión. Los test de recuperación (%) se emplearon para la determinación de la exactitud utilizando 5 niveles de concentración de las muestras. Los límites de detección de los compuestos estudiados se calcularon considerando la desviación estándar del ruido analítico, que fue siete veces el valor de la desviación estándar del blanco, y la pendiente de la línea de regresión. Los límites de detección se determinaron como la menor concentración dando respuesta de 10 veces la media del ruido de la línea de base y se calculó utilizando siete muestras (**Artículos 2, 4 y 5**).

3.4. Caracterización de compuestos fenólicos

3.4.1. Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido total de compuestos fenólicos de los extractos hidrolizados y no hidrolizados se determinó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu puesto a punto por Roldan-Marín *et al.* (2009) con algunas modificaciones. El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los

grupos fenólicos de la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (se forma por las sales en medio ácido), de color amarillo, al ser reducido da lugar a un cromógeno de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido de polifenoles, siendo dicha intensidad proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula.

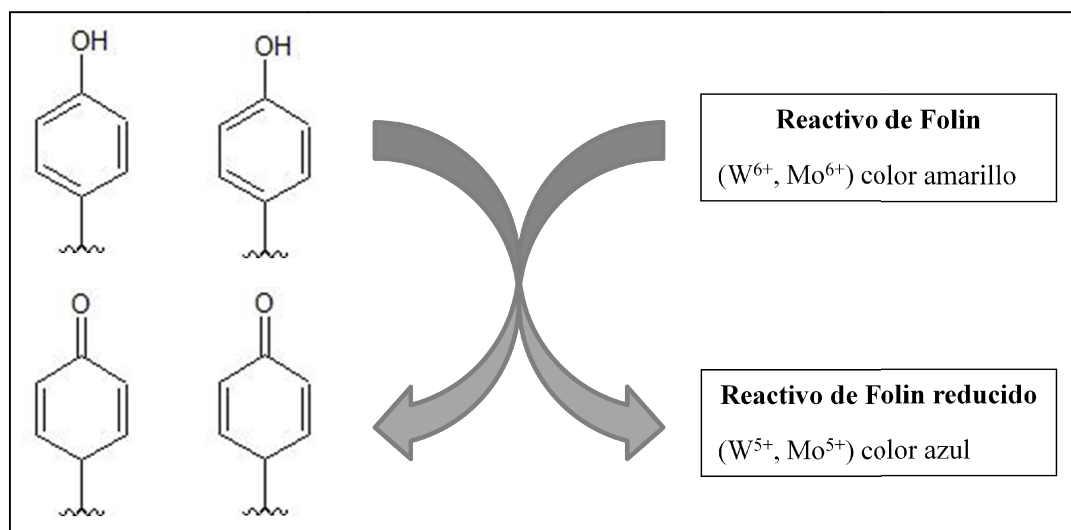


Fig 14. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu

El ensayo se llevó a cabo añadiendo 7,5 mL de agua desionizada a 1 mL de cada extracto y 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitó y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadió 1 mL de la disolución de carbonato sódico saturado y se agitó de nuevo, dejando la mezcla 1 h en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 760 nm. La determinación se realizó por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del patrón externo, mediante una curva de calibrado de ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de pf.

3.4.2. Identificación y cuantificación de flavonoles

La identificación y la cuantificación de los flavonoles existentes en las muestras se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) (Agilent 1100 en **Artículo 3**) provisto de una bomba cuaternaria y un detector de fotodiodo. Las muestras fueron centrifugadas (13000 x g a 4 °C durante 10 min). El sobrenadante se separó y se evaporó a vacío a 35 °C hasta alcanzar un volumen final de 10 mL, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se inyectó en el sistema cromatográfico. La columna utilizada fue C-18Hypersil ODS (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) y termostatizada a 25 °C. Los eluyentes

utilizados fueron ácido fórmico 0,1 % en agua (solución A) y acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico (solución B) en un flujo de 1 mL/min. Comenzando con un 10 % el gradiente utilizado para la solución B fue el siguiente: 10 – 26 % durante 40 min, 26 – 65 % durante 10 min, desde 65 – 10 % durante 2 min y elución isocrática al 10 % durante 3 min. La detección se realizó en un detector de diodos seleccionando 360 y 280 nm como longitudes de onda. Se utilizó Agilent Chemstation para la adquisición de datos y su análisis. La identificación de los flavonoles se obtuvo comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción UV-visible con los obtenidos por los patrones comerciales y comparando con los datos de flavonoles publicados en la bibliografía. La cuantificación de los flavonoles se llevó a cabo a partir de curvas de calibración preparadas con patrones externos de: quercetina 4'-diglucósido (Q4G), quercetina 3'4'-diglucósido (Q3,4G), quercetina 3-glucósido (Q3G), quercetina e isorhamnetina, en el rango de 10 a 150 µg/mL. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron en µmol por 100 g de pf.

La identificación de los flavonoles se confirmó mediante una segunda detección, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC- MS), utilizando idénticas condiciones cromatográficas a las utilizadas para los análisis con HPLC-DAD. Se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 1100 series LC, equipado con una bomba cuaternaria, con un desgasificador integrado, un automuestrador, un termostato en el compartimento de columna, y DAD, acoplado a un cuadrupolo simple G1946D como detector de masas. La obtención de los datos y su análisis se llevó a cabo con Agilent Chemstation. La ionización se efectuó con una fuente de ionización a presión atmosférica (API) que utiliza una interfase de ionización por electrospray (ESI), se operó en modo negativo y en modo positivo, con el voltaje de electrospray fijado en +3500 y -3500 V, respectivamente, fragmentador en 150 V, el gas nebulizante a una tasa de flujo de 12 L/h, la presión del nebulizador fue de 45 psig y la temperatura de secado de 350 °C. Los datos del espectrómetro de masas se obtuvieron en modo SCAN, en un rango de masas de 100 a 1000 *m/z*.

3.5. Determinación de la actividad antiinflamatoria

3.5.1. Actividad inhibitoria de la hialuronidasa

La hialuronidasa es una enzima capaz de hidrolizar el ácido hialurónico, el cual se

encuentra de forma abundante en la matriz extracelular. El potencial de los agentes inhibidores de la enzima hialuronidasa puede ser evaluado en la capacidad de mantener la estructura del ácido hialurónico, lo que implicaría servir como agentes antiinflamatorios. La medida de la actividad de la hialuronidasa fue realizada por espectrofotometría (**Artículo 3**).

La preparación del extracto de cebolla y la medida de la actividad hialuronidasa se realizó siguiendo el método descrito por Bralley *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Los extractos de cebolla en etanol/agua (50:50, v/v) se disolvieron de manera apropiada con el buffer de acetato (0,2 M ácido acético-acetato sódico, pH 6,0 y 0,15 M NaCl). Las soluciones stock de ácido hialurónico (4 mg/mL) y la hialuronidasa (1 mg/mL) se prepararon a diario con el buffer de acetato. La reacción se empezó mezclando en un tubo de ensayo: 300 µg de ácido hialurónico, 0-250 µL de extracto de cebolla, buffer de acetato, y 30 µg de la enzima hialuronidasa, e inmediatamente se incubó a 37 °C durante 15 min. La reacción se paraba añadiendo 2 mL de 2,3 % bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (w/v) en 2 % NaOH y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Los valores de las absorbancias se midieron a 400 nm frente a un blanco en un espectrofotómetro Modelo Ultrospec 4300 Pro, marca Biochrom Ltd. (Cambridge, England). Los resultados se expresaron como se describe en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(OD_s - OD_c)}{\Delta OD_c} \times 100 \right]$$

OD_s = densidad óptica de la muestra

OD_c = densidad óptica del control

ΔOD_c = incremento de la densidad óptica del control

3.5.2. Captación de radicales libres de óxido nítrico

La captación de radicales libres del óxido nítrico fue determinada según el método descrito por Harza *et al.* (2008). Se basa en que a pH fisiológico, el óxido nítrico generado a partir de una solución acuosa de nitroprusiato sódico (SNP) interactúa con el oxígeno para producir iones nitrito que pueden ser cuantificados por la reacción de Griess Ilosvay.

La mezcla de reacción contenía 10 mM de SNP, 100 µL de extracto de cebolla y solución tampón fosfato salino hasta alcanzar un volumen final de 3 mL. Se incubó a 25 °C durante 150 min, seguidamente se agitó y se extrajo 0,5 mL de la mezcla. La cantidad

extraída se añadió a un tubo de ensayo con 1 mL de sulfanilamida (0,33 % de ácido acético glacial al 20 %) y se dejó reposar a temperatura ambiente 5 min. A continuación se añadió 1 mL de dihidrocloruro de N-1-naftilendiamina (NED) (0,1 %, w/v) y la mezcla se incubó a 25 °C durante 30 min.

El cromóforo rosa generado durante la diazotación de iones de nitrito con sulfanilamida y el acoplamiento subsiguiente con NED se midió por espectrofotometría a 540 nm frente al blanco. Los resultados se expresaron en μmol de equivalentes de Trolox por 100 g de pf. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del patrón externo (Artículos 3, 4 y 5).

3.6. Determinación de la actividad antioxidante

Para la correcta evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se utilizaron 4 métodos por sus diferencias en mecanismos de reacción, oxidación y especies reactivas:

3.6.1. Medida del secuestro del radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonato) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$)

La capacidad antioxidante de las diferentes muestras de cebolla fue determinada mediante el ensayo $\text{ABTS}^{\bullet+}$ siguiendo el método descrito por Re *et al.* (1999) incluyendo una adaptación del método a microplacas de 96 pocillos. El método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Las medidas se realizaron a una longitud de onda de 734 nm en un lector de microplacas. Todas las muestras se analizaron por triplicado, los resultados se expresaron en μmol de equivalentes de Trolox por 100 g de pf (Artículos 3, 4 y 5).

3.6.2. Medida del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{\bullet})

El DPPH^{\bullet} es un radical estable de color violeta debido a la deslocalización de un electrón que presenta un máximo de absorción a 517 nm. Cuando un compuesto antioxidante reduce el radical donando un electrón, disminuye la absorbancia por la

formación de un compuesto no radicalario de color amarillo.

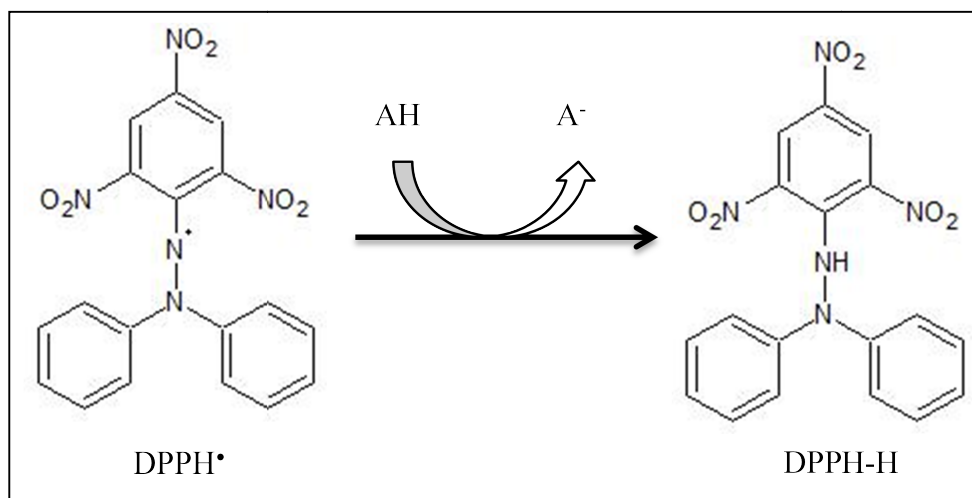


Fig15. Secuestro del radical $DPPH^{\bullet}$ por un antioxidante (AH)

Se siguió el método descrito por Sánchez-Moreno *et al.* (2009) modificado por nuestro grupo hasta alcanzar las condiciones óptimas para ser llevado a cabo en microplaca de 96 pocillos. Para hacer las curvas dosis-respuesta se añadieron 10 μ L por triplicado de muestra o de los patrones (ácido ascórbico o Trolox) a cada pocillo de la placa. A continuación se añadieron 290 μ L del radical $DPPH^{\bullet}$ (100 μ M) disuelto en metanol y después de 1 h de incubación en la oscuridad se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados fueron expresados en μ mol de equivalentes de Trolox por 100 g de pf (Artículos 3, 4 y 5).

3.6.3. Medida de la capacidad de reducción férrica (FRAP)

El potencial antioxidante total de la muestra se determinó mediante el ensayo FRAP puesto a punto por Benzie y Strain (1996), incluyendo una adaptación del método a microplaca de 96 pocillos. El método se basa en la capacidad de un compuesto de donar un electrón reduciendo el ión férrico a ferroso en medio ácido. Se adiciona 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) que se une al ión ferroso formando un compuesto de color azul que absorbe a 593 nm.

El reactivo FRAP fue preparado mezclando tampón acetato 0,3 M a pH 3,6, TPTZ 10 mM en 40 mM de HCl y $FeCl_3$ 20 mM en una proporción de 10:1 (v/v/v), respectivamente. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos donde se añadieron 10 μ L por triplicado de cada una de las muestras o de los patrones –ácido ascórbico o Trolox – para hacer las curvas dosis-respuesta a cada pocillo de la placa. Después de añadir

los 290 μ L del reactivo FRAP, las placas se incubaron durante 20 min a 37 °C en oscuridad y se midió la absorbancia a 593 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del patrón externo. Para ello se construyó una curva de calibrado de cinco niveles de concentración del patrón. Los resultados se expresaron como μ moles de equivalentes de Trolox por 100 g de pf (**Artículos 3, 4 y 5**).

3.6.4. Medida de la capacidad antioxidante por fotoquimioluminiscencia (PCL)

La medida de la capacidad antioxidante por fotoquimioluminiscencia fue determinada utilizando el sistema PHOTOCHEM (Analytik-Jena). El método combina el estímulo fotoquímico de formación radical con la referencia luminométrica sensible. En este sistema, el radical superóxido O_2 se crea por interacción de oxígeno con productos intermediarios fotoinducidos de luminol; parte de estos radicales O_2 son inactivados por los antioxidantes presentes en las muestras, y los radicales que quedan son cuantificados por la reacción de detección de luminiscencia. Este método permite la cuantificación de la capacidad antioxidante de las sustancias hidrofílicas y lipofílicas frente al radical superóxido, por medio de dos kits comerciales: capacidad antioxidante en sustancias hidrosolubles (ACW) y la capacidad antioxidante en sustancias liposolubles (ACL). Ambas determinaciones se llevaron a cabo según las especificaciones del fabricante de los kits comerciales. Todas las muestras se determinaron por triplicado. Los resultados se expresaron como μ mol de equivalentes de ácido ascórbico para las muestras liposolubles y como μ mol de equivalentes de Trolox para las muestras liposolubles, ambas por 100 g de pf (**Artículo 3**).

3.7. Animales y diseño experimental

El diseño experimental fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense de Madrid (España) en el marco del proyecto AGL2010-15910 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. El experimento se realizó con una población de 24 ratas Wistar macho con un peso medio de 250 ± 10 g que fueron suministradas por la empresa Harlan Laboratories Models (Harlan, S.L, Barcelona, España). Las ratas se sometieron a un periodo de aclimatación de 3 días, alimentadas con una dieta normal (Panlab, SLU, Barcelona, España). Los animales fueron colocados de forma individual en jaulas

metabólicas situadas en una habitación a una temperatura ambiente de $22,5 \pm 0,5$ °C con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Las ratas fueron alimentadas con la dieta control (dieta sintética estandarizada AIN-93M para roedores; **Tabla 5**) durante 4 días para una mejor adaptación. Posteriormente fueron distribuidas en 3 grupos en función del tipo de dieta: dieta control (C), compuesta por una mezcla homogénea de 100 % de dieta para roedores; dieta rica en colesterol (HC), dieta control con un 2 % de colesterol y un 0,5 % de ácido cólico; y dieta rica en colesterol enriquecida con cebolla (HCO), idéntica a la dieta HC pero con un 10 % de polvo de cebolla. La cantidad de almidón de maíz en las dietas HC y HCO se ajustó para compensar la adición de colesterol y ácido cólico; y la cantidad de celulosa en la dieta HCO se ajustó para compensar la adición de cebolla en polvo. El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum* durante las 7 semanas que duró el experimento. El peso corporal se registró semanalmente y el consumo de comida diariamente. (**Artículos 4 y 5**).

Tabla 5. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes (g/kg)	Control	HC	HCO
Cebolla en polvo	-	-	100
Caseína	200	200	200
Sacarosa	100	100	100
Almidón de maíz	470,49	445,49	368,69
Aceite de soja	50	50	50
Aceite de maíz	80	80	80
Mezcla de minerales*	35	35	35
Mezcla de vitaminas†	10	10	10
Celulosa en polvo	50	50	26,8
Bitrarrtrato de colina	2,5	2,5	2,5
Terbutilhidroquinona	0,010	0,010	0,010
L-cistina	2	2	2
Colesterol	-	20	20
Ácido cólico	-	5	5

El contenido energético de la dieta se calculó a partir de los siguientes factores 16,73 kJ/g (4 kcal/g) para las proteínas, 15,69 kJ/g (3,75 kcal/g) para los monosacáridos, 16,53 kJ/g (3,95 kcal/g) para los disacáridos, 17,49 kJ/g (4,18 kcal/g) para el almidón, 8,37 kJ/g (2 kcal/g) para la fibra dietética, y 37,65 kJ/g para la grasa. El contenido energético de cada una de las dietas fue el siguiente: dieta control, 18540,9 kJ/kg (4431,4 kcal/kg); dieta HC, 18856,6 kJ/kg (4506,8 kcal/kg) y para la dieta HCO, 18642,4 kJ/kg (4455,6 kcal/kg).

Tabla 6. Mezcla de minerales de las dietas experimentales (AIN-93M-MX)*

Mineral	g/kg
Carbonato de calcio anhidro	357,00
Fosfato de potasio monobásico	250,00
Potasio citrato monohidrato	28,00
Cloruro de sodio	74,00
Sulfato de potasio	46,00
Óxido de magnesio	24,00
Citrato férrico	6,06
Carbonato de zinc	1,65
Metasilicato de sodio 9H ₂ O	1,45
Carbonato de manganeso	0,63
Carbonato de cobre	0,30
Sulfato de cromo y potasio 12H ₂ O	0,275
Ácido bórico	0,0815
Fluoruro de sodio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Cloruro de litio	0,0174
Sodio selenato anhidro	0,01025
Yodato de potasio	0,0100
Paramolibdato de amonio 4H ₂ O	0,00795
Vanadato amónico	0,006
Sacarosa en polvo	209,806

Tabla 7. Mezcla de vitaminas de las dietas experimentales (AIN-93M-VX)[†]

Vitaminas	g/kg
Niacina	3,000
Pantotenato de calcio	1,600
Piridoxina HCl	0,700
Tiamina HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
Biotina	0,200
Vitamina B12 (0,1%)	2,500
Acetato de vitamina E (500 IU/g)	15,000
Vitamina A palmitato (500000 IU/g)	0,800
Vitamina D3 (400000 IU/g)	0,250
Vitamin K1	0,075
Sacarosa en polvo	974,655

3.8. Recogida de sangre y órganos

Al finalizar el periodo de alimentación con las diferentes dietas experimentales, y con el objetivo de evitar variaciones inter ensayo que podrían afectar a la comparación de los datos de los diferentes grupos, los animales en condiciones de ayuno fueron anestesiados y sacrificados mediante la extracción de sangre por punción cardíaca, tomando al azar un animal cada vez, de cada uno de los tres grupos. La sangre se obtuvo directamente del corazón con una jeringa y se transfirió en tubos con EDTA como anticoagulante. Por centrifugación de la sangre $1500 \times g$, 15 min, 4 °C, se obtuvieron el plasma y los eritrocitos, y se almacenaron inmediatamente a -80 °C hasta su análisis. A continuación, se diseccionaron las ratas y se obtuvieron los siguientes órganos y tejidos: hígado, bazo, corazón, pulmones, páncreas, riñones, estómago, intestino grueso, intestino delgado, ciego, cerebro, cerebelo, músculo esquelético, tejido adiposo abdominal, tejido adiposo gonadal, y testículos. Todos ellos se pesaron, se congelaron con nitrógeno líquido, y se guardaron a -80 °C, hasta su análisis.

3.9. Determinación del perfil lipídico y de los parámetros bioquímicos

La determinación del colesterol total (TC), colesterol HDL (HDL-C), colesterol LDL (LDL-C), triglicéridos, glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT/GPT), aspartato aminotransferasa (AST/GOT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y bilirrubina total se realizó en las muestras de plasma de las ratas utilizando el sistema COBAS INTEGRA 400 PLUS (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland). Las fracciones de HDL-C y LDL-C se obtuvieron utilizando un reactivo precipitante (SPINREACT, SA/SAU, Girona, España). Los índices aterogénicos (AI) se calcularon a partir de las siguientes fórmulas: $AI (1) = LDL-C/HDL-C$, $AI (2) = TC/HDL-C$, $AI (3) = (TC-HDL-C)/HDL-C$.

3.10. Determinación de las propiedades bioactivas de la cebolla

3.10.1. Biomarcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT, GPx, Proteínas carboniladas)

Actividad superóxido dismutasa (SOD)

La evaluación de la actividad de la SOD en los eritrocitos y el hígado se determinó utilizando el kit comercial SOD Cayman Chemical (706002, Cayman Chemicals) y

siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno y así representan una parte crucial del sistema de defensa antioxidante celular.



El kit comercial SOD utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina (**Figura 16**). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50 % de dismutación del radical superóxido. El ensayo mide los 3 tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD). La actividad de la SOD en los eritrocitos se expresó en U/mL y en el hígado en U/mL proteína (**Artículo 5**).

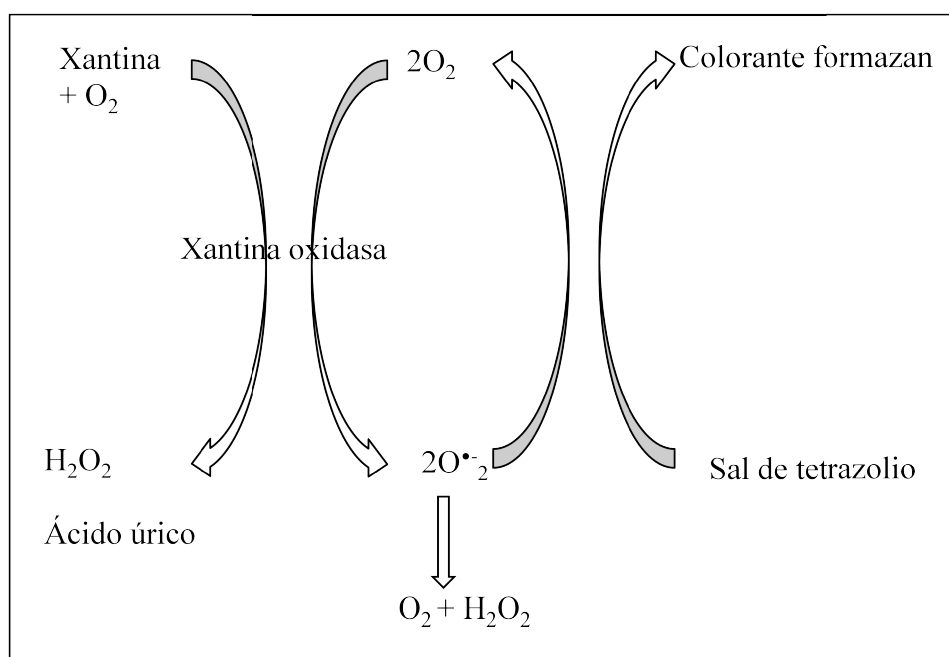


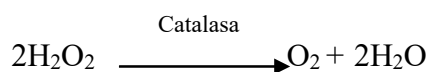
Fig 16. Esquema ensayo de la SOD

Actividad catalasa (CAT)

La evaluación de la actividad de la catalasa (CAT) en los eritrocitos y el hígado se determinó utilizando el kit comercial Catalase Assay Kit (707002, Cayman Chemicals) y siguiendo las instrucciones del proveedor.

La catalasa es una enzima antioxidante que está presente en la mayoría de células aeróbicas. La catalasa está involucrada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que es una especie reactiva de oxígeno (ROS), producto tóxico del metabolismo

aeróbico normal y la producción de ROS patógena. Esta enzima cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 a oxígeno molecular y dos moléculas de agua.



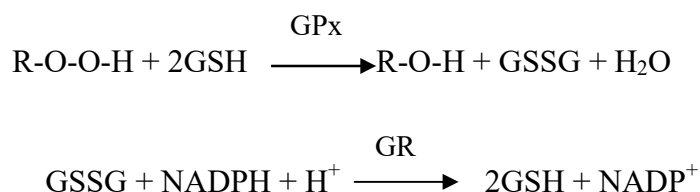
El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purplad) como cromógeno. Purplad forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que en los cambios de oxidación pasa de incoloro a un color púrpura. La actividad de la catalasa en los eritrocitos se expresó en nmol/min/mL y en el hígado en nmol/min/mg proteína (**Artículo 5**).

Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

La evaluación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en los eritrocitos y el hígado se determinó utilizando el kit comercial Glutathion Assay Kit (703102, Cayman Chemicals) y siguiendo las instrucciones del proveedor.

La enzima GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxido de hidrógeno, por la reducción de glutatión y las funciones de protección de la célula frente al daño oxidativo.

El ensayo utilizado para la GPx, mide la actividad GPx indirectamente por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido después de la reducción de hidroperóxido por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH.



La oxidación de NADPH a NADP^+ está acompañada por una disminución en la absorbancia a 340 nm. Bajo condiciones en las que la tasa de actividad de la GPx es limitante, la tasa de disminución en A_{340} es directamente proporcional a la actividad de la GPx en la muestra.

Los resultados de la actividad de la GPx en eritrocitos se expresaron en nmol/min/mL y en hígado en nmol/min/mg proteína (**Artículo 5**).

El contenido total de proteína en los homogenizados de hígado se midió utilizando el kit comercial de ensayo de proteínas (Bio-Rad Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories).

Proteínas carboniladas

El contenido de proteínas carboniladas se midió en los homogeneizados de hígado según las especificaciones del fabricante (Cayman Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit, 10005020).

El método se fundamenta en que los grupos carbonilos de las proteínas reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando una base de Schiff para reducir la hidrazona correspondiente, cuantificable espectrofotométricamente a una absorbancia de 360 a 385 nm. Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteína de tejido homogeneizado (**Artículo 5**).

3.10.2. Biomarcadores de inflamación y de riesgo cardiovascular

Los biomarcadores de inflamación y de riesgo cardiovascular en el plasma de los roedores se midieron mediante kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles plasmáticos de la interleuquina-1 alfa (IL-1 α), la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-10 (IL-10), el interferón- γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la leptina, la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se determinaron utilizando el kit comercial Rat Cytokine/Chemokine magnetic bead panel kit (RECYTMAG-65K; EMD, Millipore Corp, Missouri, USA) y se midió con la tecnología Luminex xMAP® basada en el uso de microesferas de poliestireno, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para la determinación de los niveles plasmáticos del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1) y el factor von Willebrand (vWF) se utilizó el kit comercial Milliplex® Map Rat Cardiovascular panel 1 (RCVD1-89K) y el kit Milliplex® Map Rat Cardiovascular panel 2 (RCVD2-89K) se utilizó para determinar la molécula de adhesión intercelular-1 (s-ICAM-1) y la sE-selectina. Los resultados se expresaron en pg/mL.

3.10.3. Análisis de ácidos grasos

Se analizaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) en plasma, eritrocitos, hígado y tejido adiposo de las ratas.

Las muestras se colocaron en tubos cónicos para centrífuga y se sonicaron con 2 mL de metanol usando un homogenizador Hielscher modelo PH50 equipado con un sonotrodo MS2 (Teltow, Germany). La amplitud y el ciclo se fijaron a 80 % y 0,8 %, respectivamente. Las muestras se mantuvieron en un baño de hielo durante los 15 s de la sonicación, se dejaron en reposo 10 s, y se repitió el proceso 4 veces. Las muestras se transfirieron a tubos de vidrio de borosilicato a prueba de ácido/calor que contenían 100 µL de ácido tridecanoico en hexano, utilizado como patrón interno para la cuantificación (1,28 mg/mL).

Posteriormente, los FAMES se obtuvieron mediante una esterificación directa, método descrito por Castro-Gómez *et al.* (2014). Brevemente, 1 mL de H₂SO₄ 3 M en metanol se añadió a cada tubo y se calentó durante 30 min a 98 °C. Después de la incubación, las muestras se enfriaron en hielo durante 5 min, se añadió 1 mL de hexano, se mezcló en un agitador tipo vórtex durante 30 s y finalmente se paró la reacción añadiendo 7,5 mL de una solución 6 % de hidrogenocarbonato de sodio y se centrifugó a 1000 x g a una temperatura de 4 °C durante 5 min. La capa orgánica superior que contenían los FAMES se recogió y se transfirió a viales opacos para inyección por GC-MS.

Los FAMES se inyectaron (1 µL; relación de división 1:10) en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Palo Alto, CA, USA) equipado con una columna capilar 100 m CPSil-88 (100 m x 0,25 mm i.d x 0,2 µm espesor de la película, Chromopack, Middleburg, Netherlands) y con detector MS (Agilent 5973N; temperatura de línea de transferencia: 250 °C; temperatura de la fuente: 230 °C; temperatura del cuadrupolo: 150 °C; ionización por impacto de electrones: 70 eV; funcionamiento modo SCAN: 50- 550 Da). Las condiciones y la temperatura fueron las descritas por Rodríguez-Alcalá *et al.* (2007).

La grasa de referencia utilizada para la obtención de los factores de respuesta fue BCR-164. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.10.4. Efecto prebiótico

Las muestras de heces frescas se recogieron en la semana 1 y la semana 7 del experimento en condiciones asépticas en tubos estériles de plástico pesados previamente. Para la determinación microbiológica de las muestras de heces de rata se procedió a la pesada de $1,0 \pm 0,5$ g de la muestra en condiciones asépticas sobre tubos de vidrio que contenían 9 mL de agua de peptona tamponada estéril (Cultimed-Panreac, España). Posteriormente se homogeneizó la muestra junto con el diluyente mediante vortex (Vortex Modelo LabDancer S40, VWR; USA) durante 1-2 min. A continuación, se procedió a

realizar diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-11}$) utilizando como diluyente el agua de peptona tamponada estéril, y posteriormente se realizó la siembra en los diferentes medios de cultivo:

Aerobios totales 30 °C

La determinación de los aerobios totales a 30 °C se realizó mediante una siembra en profundidad de 1 mL de las disoluciones en un medio PCA agar estéril (Plate Count Agar, Cultimed) preparado según las indicaciones del fabricante y atemperado a 47 ± 2 °C. Una vez solidificadas las placas se incubaron en estufa a 30 ± 2 °C durante 72 ± 2 h de forma invertida. El recuento se realizó sobre placas en las que se produjo un crecimiento de colonias entre 0 y 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y los resultados se expresaron en UFC/g muestra.

Enterobacterias

El análisis microbiológico de las enterobacterias se realizó mediante una siembra en profundidad con doble capa en medio VRBG estéril (Agar Rojo Bilis Violeta Glucosa, Cultimed) preparado según las condiciones del fabricante y atemperado a 47 ± 2 °C para conseguir condiciones anaeróbicas. Seguidamente se incubó en estufa a 30 ± 2 °C durante 48 ± 2 h de forma invertida. El recuento de colonias de color morado, se realizó en las placas en las que se produjo un crecimiento de colonias entre 0 y 300 UFC. Los resultados se expresaron en UFC/g muestra.

Escherichia coli β-glucuronidasa positivos y coliformes totales

La determinación de *E. coli* β-glucuronidasa positivos y coliformes totales se realizó mediante una siembra en profundidad con doble capa de medio ChromID Coli estéril (Coli ID-F, Biomérieux) fundido y atemperado a 47 ± 2 °C. Seguidamente se incubó en estufa a 37 ± 2 °C durante 18-24 h de forma invertida. El recuento se realizó sobre placas en las que se produjo un crecimiento entre 0 y 150 UFC, las colonias de *E. coli* β-glucuronidasa positivo son rosas y las colonias de coliformes totales son el sumatorio de todas las colonias. Los resultados se expresaron en UFC/g muestra.

Bacterias lácticas

La determinación de las bacterias lácticas se realizó mediante una siembra en profundidad de 1 mL con doble capa de medio MRS agar estéril (Agar Man Rogosa y

Sharpe, Merck) preparado según las indicaciones del fabricante y atemperado a 47 ± 2 °C. Una vez solidificadas las placas se incubaron en estufa a 30 ± 2 °C durante 72 ± 2 h de forma invertida. El recuento se realizó sobre placas en las que se produjo un crecimiento entre 0 y 300 UFC y los resultados se expresaron en UFC/g muestra.

Bifidobacterias

La determinación de las bifidobacterias se llevó a cabo mediante una siembra en profundidad de 1 mL de las diluciones adicionando una doble capa de medio MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, Merck) enriquecido con solución estéril de cisteína al 0,05 % preparado según las instrucciones del fabricante y atemperado a 47 ± 2 °C. Una vez solidificadas las placas, se incubaron en jarra de anaerobiosis junto con sobres generadores de condiciones anaeróbicas (Anaerocult (Merck) para crear anaerobiosis) y se incubaron en estufa a 37 ± 2 °C durante 72 ± 2 h de forma invertida. EL recuento se realizó en placas en las que se produjo un crecimiento entre 0 y 300 UFC, las colonias típicas son de color blanco-lechoso. Los resultados se expresaron en UFC/g muestra.

Clostridium sulfito-reductores

La determinación de los *Clostridium* sulfito-reductores se realizó mediante una siembra en profundidad de 1 mL de las diluciones adicionando una doble capa para conseguir condiciones anaerobias, en medio Sulfito Polimixina Sulfadiazina Agar estéril (SPS Agar, Cultimed) preparado según las indicaciones del fabricante y atemperado a 47 ± 2 °C. Una vez se había enfriado la segunda capa, se incubó en jarra de anaerobiosis junto con sobres generadores de condiciones anaerobias (Anaerocult, Merck) y se incubaron a 46 ± 1 °C durante un total de 24 – 48 h. El recuento se realizó en placas en las que se produjo un crecimiento de colonias entre 0 y 300 UFC, las colonias típicas son de color negro. Los resultados se expresaron en UFC/g de muestra.

3.11. Análisis estadístico

En general, los resultados se obtuvieron como la media \pm la desviación estándar (SD) de tres medidas independientes. Por un lado, el análisis estadístico realizado para los datos de los **artículos 1, 2 y 3** se efectuó a partir del diseño factorial completo con dos factores: grupo (-cebolla troceada- CT, -cebolla liofilizada-CL y -cebolla pulverizada-CP) y tratamiento (T0, T1, T2 y T3). Con el objetivo de estudiar los efectos principales por

separado (grupo y tratamiento) y el efecto de la interacción (grupo \times tratamiento) se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Al observarse en la mayoría de los casos un efecto significativo de la interacción, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, comparando las medias en el mismo grupo para los diferentes tratamientos y en el mismo tratamiento para los diferentes grupos. Se utilizó el test de Levene para verificar la homogeneidad de las varianzas. Las diferencias significativas fueron determinadas según las pruebas *post-hoc* de Tamhane's T2 (no asumiendo igualdad de varianzas) y Tukey's *b* (asumiendo igualdad de varianzas). Se utilizó el test de *t* Student's para comparar pares de medias y determinar un nivel de significación de $P \leq 0,05$. Las correlaciones entre variables se examinaron por la correlación de Pearson. Por otro lado, los datos de los **artículos 4 y 5** fueron analizados utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, el test de Levene se utilizó para verificar la homogeneidad de las varianzas. Las pruebas *post-hoc* de Tamhane's T2 (no asumiendo igualdad de varianzas) y Bonferroni (asumiendo igualdad de varianzas) se utilizaron para determinar diferencias entre grupos ($P \leq 0,05$). El programa informático utilizado para los análisis estadísticos fue el IBM SPSS Statistics 21 (Spss Inc. an IBM Company).

4.Resultados

ARTÍCULO 1

Nutritional Composition of Processed Onion: *S*-Alk(en)yl-L-cystine Sulfoxides, Organic acids, Sugars, Minerals, and Vitamin C

Clara Colina-Coca, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno

Food and Bioprocess Technology (2014)

DOI: 10.1007/s11947-013-1150-4

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of onion high-pressure processing (HPP) and HPP combined with freeze-drying and pulverization, focusing on onion nutritional attributes in terms of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, organic acid, sugar, mineral, and vitamin C contents. *Allium cepa* L. var. *cepa*, ‘Recas’ was treated at T1 (200 MPa/25 °C/5 min), T2 (400 MPa/25 °C/5 min), and T3 (600 MPa/25 °C/5 min). After treatment, high-pressure (HP)-treated (T1, T2, and T3) and untreated or non-HP-treated (T0) samples were frozen (diced onion). Subsequently, part of the diced samples was freeze-dried and pulverized (pulverized onion). In general, the freeze-drying process of fresh onion maintained the concentration of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (ACSOs), organic acids, total sugars, total protein, and minerals, and significantly increased vitamin C concentration. Regarding HPP, the concentration of ACSOs, total sugars, and vitamin C of fresh onion was preserved at the three HPP assayed (200, 400, 600 MPa for 5 min at 25 °C); however, for some organic acids and minerals, small decreases were found. In HP-treated onion (especially for treatment at 400 MPa), freeze-drying retained the levels of the major organic acids, total sugars, total protein, and minerals (Ca, Fe, Mg, K, Na, Zn, Mn, and Se), and increased the content of ascorbic acid and total vitamin C.

Keywords: *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (ACSOs); Organic acids; Sugars; Minerals, Vitamin C; Onion (*Allium cepa* L.); High-pressure processing; Freeze-drying; Pulverization.

ARTÍCULO 2

Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS GC-MS)

Clara Colina-Coca, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno

Talanta (2013)

DOI: [10.1016/j.talanta.2012.10.022](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.022)

ABSTRACT

A novel headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS GC–MS) method was developed for analysis of volatile compounds in onion (*Allium cepa* L. var. *cepa*, ‘Recas’). MS was operated using full scan mode and selective ion monitoring (SIM) mode in order to quantify some specific compounds with increased sensitivity relative to full scan mode. The limits of detection and quantitation ranged from 0.1 to 0.10 mg/g and from 0.02 to 3.83 mg/g fresh weight, respectively, for studied compounds.

The procedure allowed the identification of eighteen compounds and quantitation of nine compounds in the volatile fraction of onion, belonging mainly to di-, and trisulfides and aldehydes. These methods were applied to evaluate how high-pressure (HP) as a processing technology affects onion volatile compounds, responsible in part of the onion biological activity. Onion samples were treated at T1: 200 MPa/25 1C/5 min, T2: 400 MPa/25 1C/5 min and T3: 600 MPa/25 1C/5 min (treatments). In addition, the difference among diced, freeze-dried and pulverized onions (groups) was studied, in order to select the process more adequate for better preserving volatile compounds. The results obtained in full scan mode showed that both main factors (group and treatment) had a significant effect ($P < 0.001$). There were also significant differences between groups and treatments for all compounds, being the main effect of group more marked by HS GC–MS using selective ion monitoring (SIM) mode. For 2-methyl 2-pentenal, dimethyl trisulfide, and methyl propyl trisulfide it has been observed an increase in freeze- dried and pulverized onion samples compared with diced samples regardless the HP treatment. However, freeze-drying and pulverization processes affected the stability of propionaldehyde, 1-propanethiol, hexanal, dipropyl disulfide, and dipropyl trisulfide, diminishing their content regardless the HP treatment. HP at 200 and 400 MPa/25 1C/5 min were the least detrimental treatments to the total fraction of volatile compounds, not affecting or even increasing the levels of some volatile compounds.

Keywords: Headspace GC-MS; Scan Mode; SIM mode; Onion; Volatile compounds; Sulfides; High-pressure processing.

ARTÍCULO 3

Hyaluronidase Inhibiting Activity and Radical Scavenging Potential of Flavonols in Processed Onion

Diana González-Peña, Clara Colina-Coca, Cielo D. Char, M. Pilar Cano, Begoña de
Ancos, Concepción Sánchez-Moreno

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2013)

DOI: 10.1021/jf3054356

ABSTRACT

The flavonol content and anti-inflammatory and antioxidant activities of onion treated by high-pressure processing (HPP) and HPP combined with freeze-drying and pulverization (HPP-FD-P) were evaluated. *Allium cepa* L. var. *cepa*, 'Recas' was treated at T1 (200 MPa/25 °C/5 min), T2 (400 MPa/25 °C/5 min), and T3 (600 MPa/25 °C/5 min). After treatment, HP-treated and untreated samples were frozen (diced onion, HP-treated). Subsequently, part of the diced samples was freeze-dried and pulverized (pulverized onion, HP-treated and freeze-dried). Flavonol content and anti-inflammatory and antioxidant activities (hyaluronidase inhibiting activity, NO[•], ABTS^{•+}, and DPPH[•] scavenging capacity, ferric reducing antioxidant power, and antioxidative capacity by photochemiluminescence) were measured in nonhydrolyzed and hydrolyzed extracts. Hydrolysis was carried out in order to evaluate the effect of HPP and HPP-FD-P on both anti-inflammatory and antioxidant activities of extracts mainly containing aglycone forms. HPP-FD-P increased quercetin 3,4'-diglucoside, quercetin 4'-glucoside, quercetin 3-glucoside, and isorhamnetin 3,4'-diglucoside extractability. The present study suggests that HPP (especially treatment at 400 MPa) and HPP-FD-P may be of benefit for obtaining functional ingredients from onion, as suggested by increased NO[•] scavenging capacity and maintenance of the antioxidant activity mainly in hydrolyzed extracts.

Keywords: Flavonols; HPLC-ESI-MS; Antihyaluronidase activity; NO[•] scavenging capacity; Antioxidant properties; Onion; High-pressure processing; Freeze-drying; Pulverization.

ARTÍCULO 4

Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats

Clara Colina-Coca, Luis M. Rodríguez-Alcalá, Javier Fontecha, Diana González-Peña, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno

Food Research International (2014)

DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.047

ABSTRACT

The complex biochemical composition of onions has been studied as a source of biological components with health-related properties. The evolution of hypercholesterolemia is associated with a large range of alterations considered as strong risk factors for many cardiovascular events. The objective of this study was to investigate the effects of onion as functional ingredient on plasma, erythrocyte, liver and adipose tissue fatty acid composition in hypercholesterolemic male Wistar rats. Rats ($n = 24$) were randomly divided into three groups: control (C), high-cholesterol (HC), and high-cholesterol enriched with onion (HCO) groups. At the end of 7 weeks, animals were anesthetized and euthanized by extracting blood by cardiac puncture. Plasma, erythrocytes, liver and adipose tissue were collected and immediately stored at -80°C . Fatty acid methyl esters were identified and quantified by GC/MS. Total fatty acid concentration decreased in liver and adipose tissue both in HC and HCO groups. SFA content was significantly higher in plasma, erythrocytes and liver in the C group compared to

HC and HCO groups. In contrast, SFAs increased in adipose tissue both in HC and HCO groups compared to the C group. A significant increase in MUFA content in plasma was found in HC and HCO groups compared to the C group; in erythrocytes and liver the increase was lower. In plasma, PUFA content was significantly lower in HC and HCO groups compared to the C group. Interestingly, in liver and adipose tissue, PUFAs increased in HC and HCO groups compared to the C group. Results showed noticeable effects on individual fatty acid composition when assaying high-cholesterol diets in rats, in some cases enhanced by onion enrichment. Further research is needed to deeper understand the involved mechanisms and pathways.

Keywords: Onion as a functional ingredient; Hypercholesterolemic diet; Fatty acid methyl esters (FAMES); Saturated fatty acids (SFAs); Monounsaturated fatty acids (MUFAs); Polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

ARTÍCULO 5

Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats

Clara Colina-Coca, Diana González-Peña, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno*

Free Radical Biology and Medicine

FRBM-D-17-00282

En revisión

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a major risk factor for the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction; onion supplementation has been proposed as nutritional intervention to prevent or improve some of its associated biological impairments. The objective of this study was to investigate the effects of onion as a functional ingredient on antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic male Wistar rats.

Rodents ($n = 24$) were fed three different diets: control (C), high-cholesterol (HC), and high-cholesterol enriched with onion (HCO). After 7 weeks of experimental feeding, blood and organs were collected. Antioxidant enzymes were measured in erythrocytes and liver, whereas plasma was used for the analysis of cytokines, chemokines, and adhesion molecules, among other cardiovascular parameters. Furthermore, caecum and faeces were analysed to evaluate the changes produced on the microflora. Rats fed the HC diet significantly decreased erythrocyte SOD, CAT and GPx activities compared with the C group. Interestingly, the HCO group showed a significant increase in SOD, CAT and GPx activities compared with the HC group. Plasma inflammatory parameters, namely IL-10, MCP-1, VEGF, s-ICAM-1, sE-selectin, PAI-1, v-WF, and TIMP-1 were significantly increased in the HC group and onion enrichment modulated this increment. Additionally, the HCO diet reduced the presence of sulphite-reducing *Clostridium* spp. versus the HC diet. Taken together, these results suggest an improvement on the antioxidant and antiinflammatory response as well as on the cardiovascular risk biomarkers promoted by the onion ingredient.

Keywords: Functional ingredient; Antioxidant enzymes; Protein carbonyls; Oxidative stress; Cytokines; Adhesion molecules.

5.DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Caracterización cuali- y cuantitativa de los constituyentes bioactivos (compuestos organosulfurados, flavonoles, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C) de cebolla procesada por alta presión hidrostática y liofilizada

La aplicación de tratamientos de altas presiones en productos vegetales permite obtener alimentos más saludables con un valor añadido debido a su potencial actividad biológica al incrementar o mejorar la bioaccesibilidad de los nutrientes y compuestos bioactivos. La combinación de las altas presiones con un proceso de liofilización podría ser una herramienta útil para obtener un nuevo producto de cebolla seguro con efectos positivos para la salud. Además, de todos los procesos de secado, la liofilización es reconocida como el mejor proceso para mantener las propiedades beneficiosas para la salud y las características nutricionales de los productos vegetales (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011; Tseng y Zhao, 2012; Leong y Oey, 2012).

El **primer objetivo** consistió en la caracterización cuali- y cuantitativa de los compuestos bioactivos de cebolla procesada con altas presiones en muestras CT y en muestras CP que habían sido sometidas a los siguientes tratamientos: T1 (200 MPa/25 °C/5 min), T2 (400 MPa/25 °C/5 min) y T3 (600 MPa/25 °C/5 min). Todo ello con el fin de poner de manifiesto los efectos en la composición nutricional en términos del contenido de ACSOs, flavonoles, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C en muestras de cebolla sometidas a diferentes tratamientos de altas presiones en combinación con un proceso de liofilización y pulverización.

5.1.1. Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de ACSOs, ácidos orgánicos, azúcares, minerales y vitamina C

Hasta el momento no se han realizado investigaciones sobre los efectos de las altas presiones y altas presiones en combinación con un proceso de liofilización en el contenido total de los precursores del aroma en el género *Allium*, con lo que este estudio constituye una de las primeras investigaciones en este campo.

En primer lugar, se evaluó el contenido de ACSOs en las muestras T0 (CTT0 y CPT0), no observándose cambios estadísticamente significativos en dicho contenido, mostrando que el proceso de liofilización no afectó significativamente el contenido total de

ACSOs.

A continuación, se evaluó el efecto de las altas presiones en el contenido de ACSOs, en muestras CT y CP. Independientemente del nivel de presión aplicado en las muestras CT, el contenido de ACSOs se mantuvo prácticamente inalterado con niveles similares a los de las muestras CTT0. Sin embargo, aunque de forma independiente los diferentes tratamientos con altas presiones y el proceso de liofilización y pulverización no afectaron de forma notable al contenido de ACSOs, al combinar los diferentes tratamientos (cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas, liofilizada y pulverizada) se produjo una disminución significativa en aquellas muestras que habían sido sometidas a presiones de 400 MPa (CPT2) y 600 MPa (CPT3). Esto sugirió que dicha combinación podría favorecer la reacción entre los ACSOs y la enzima aliinasa debido a los cambios producidos en los compartimentos celulares como consecuencia del tratamiento (Rose *et al.*, 2005).

El contenido de ácidos orgánicos en vegetales está íntimamente relacionado con el aroma y el sabor, además tienen una gran importancia biológica al formar parte de diferentes vías metabólicas, como el ciclo de Krebs. Los estudios realizados sobre el contenido de ácidos orgánicos en cebolla son escasos. En este sentido, se observó que las muestras de cebolla no tratadas (CTT0 y CPT0) presentaban mayor contenido de ácidos orgánicos, siendo el más abundante el ácido málico seguido por el ácido oxálico. Los valores en el presente estudio están de acuerdo con los publicados por Rodríguez Galdón *et al.* (2008), quienes analizaron el contenido de ácidos orgánicos en diferentes variedades de cebolla. Respecto al proceso de liofilización y pulverización en muestras T0, solo se observaron cambios significativos en ácidos orgánicos minoritarios, siendo dichos cambios pérdidas notorias en el contenido de ácido cítrico y de ácido fórmico. A grandes rasgos, con la excepción del ácido málico, se puede decir que el tratamiento con altas presiones produjo pérdidas en el contenido de los ácidos orgánicos de forma individual, siendo en algunos casos más notable que en otros.

Al evaluar el efecto de las altas presiones en el contenido de ácido málico, se observó de forma general que en las muestras CT los niveles de dicho ácido orgánico presentaban una tendencia al alza, sin embargo en las muestras CP dicho contenido fue significativamente mayor. Estos datos revelaron que la combinación de las altas presiones con el proceso de liofilización y pulverización, favoreció la extractabilidad del ácido málico, probablemente debido a la activación de su formación metabólica a través de la vía glucolítica como resultado de la transformación del ácido succínico (Benkeblia y Varoquax,

2003). El ácido succínico es un intermediario del ciclo del ácido cítrico; al donar electrones a la cadena de transporte de electrones produce ácido fumárico por acción de la fumarasa (fumarato hidratasa) que cataliza la reacción reversible de hidratación/deshidratación del ácido fumárico a ácido málico.

No obstante, el tratamiento con altas presiones produjo una disminución significativa en el contenido de ácido oxálico y de ácido cítrico, siendo las muestras CTT0 y CPT0 las que presentaron una mayor concentración. Poniendo de manifiesto que la combinación de altas presiones con un proceso de liofilización mantuvo el efecto inicial de las altas presiones sobre la concentración de los ácidos oxálico y cítrico.

Los niveles de ácido pirúvico y ácido acético solo se vieron disminuidos en las muestras CPT1, CPT2 y CPT3 en comparación con las muestras T0, observándose una correlación positiva ($R=0,676$, $P=0,001$) entre el contenido de ACSOs y ácido pirúvico, indicando un mismo efecto de las altas presiones en dichos contenidos tanto en las muestras CT como en las muestras CP. Estos datos coinciden con las investigaciones realizadas por Bacon *et al.* (1999) quienes también observaron una correlación positiva entre dichos parámetros en diferentes tejidos y variedades de cebolla.

La concentración de ácido succínico y ácido fórmico disminuyó significativamente en las muestras T2 y T3, produciéndose en las muestras CT (CTT2 y CTT3) una disminución mayor en el ácido succínico. Sin embargo, en las muestras CP (CPT2 y CPT3) se observó una disminución más pronunciada en la concentración de ácido fórmico.

Las investigaciones realizadas hasta el momento han estado principalmente centradas en las variaciones del contenido de hidratos de carbono de la cebolla en relación con los cambios temporales durante el crecimiento del bulbo y su almacenamiento (Jaime *et al.*, 2001; Benkeblia y Varoquax, 2003; Cardelle-Cobas *et al.*, 2009), así como del contenido en fructanos y fructooligosacáridos de las diferentes variedades de cebolla (O'Donoghue *et al.*, 2004; Rodríguez Galdón *et al.*, 2009). Sin embargo, la información sobre cómo afectan las altas presiones al contenido de azúcares es escasa. Los valores de la concentración de los diferentes azúcares en el presente estudio en muestras CTT0 estaban dentro del rango publicado en la bibliografía (Davis *et al.*, 2007; Cardelle-Cobas *et al.*, 2009). En general, la combinación de las altas presiones con un proceso de liofilización no favoreció la extracción de fructosa, glucosa y sacarosa, al producirse una disminución significativa en el contenido de dichos azúcares en las muestras CPT1, CPT2 y CPT3. No obstante, el proceso de liofilización y pulverización no afectó al contenido total de azúcares

en cebolla no tratada (T0) aunque a nivel individual la concentración de fructosa y sacarosa aumentó significativamente. De hecho, Gao *et al.* (2012) obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de la liofilización en el contenido de glucosa y fructosa de la fruta jujube. Posiblemente, este incremento pudo ser debido a que durante el proceso de congelación previo a la liofilización de la cebolla se pudo haber alterado la estructura del tejido celular de la cebolla mejorando la extracción de ciertos compuestos como sucede con los flavonoides (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011). Por esa razón, en el presente estudio, al ser la sacarosa más soluble que la glucosa, el proceso de liofilización pudo haber facilitado la extracción de sacarosa. La sacarosa es un azúcar minoritario en la cebolla, hecho que podría explicar que dicho incremento no se detectara en el contenido total de azúcares, al mantenerse prácticamente inalterado en las muestras CT sometidas a los diferentes tratamientos con altas presiones.

En las muestras CTT0 y CPT0, la fructosa (47 y 50 %, respectivamente) y la glucosa (45 y 40 %, respectivamente) representaron el mayor porcentaje de azúcares solubles. Por lo que concierne a la concentración de fructosa extraída en las muestras CPT0 se observó un incremento de un 12 % en comparación con las muestras CTT0. El contenido de fructosa en las muestras CTT2 y CTT3 disminuyó ligeramente, mientras que en el caso de las muestras CP, el tratamiento con altas presiones, independientemente del nivel de presión aplicada, y combinado con un proceso de liofilización, produjo un descenso significativo del contenido de fructosa. Por otro lado, en las muestras CT, la concentración de glucosa extraída se vio reducida notablemente por el proceso de liofilización, pero no se vio alterada al ser sometida a los diferentes tratamientos de presión. Sin embargo en las muestras CP, el contenido de glucosa disminuyó significativamente en los 3 niveles de presión aplicados (200, 400 y 600 MPa).

La concentración de sacarosa extraída incrementó notablemente en las muestras CT, siendo significativo en las muestras CTT2. El incremento en el contenido de sacarosa puede estar relacionado con la ruptura de la integridad de la pared celular de la cebolla y la membrana causado por el tratamiento con altas presiones (González *et al.*, 2010b) teniendo como consecuencia la salida fuera de las vacuolas y cromoplastos de los compuestos solubles como azúcares, compuestos fenólicos y carotenoides.

El nivel de proteína encontrado en las muestras T0 (CTT0 y CPT0) fue similar al publicado por Benítez *et al.* (2011). El proceso de la liofilización no afectó al contenido total de proteína de la cebolla, sin embargo disminuyó significativamente en las muestras

CT y CP y sometidas a cada uno de los tratamientos (CTT1, CTT2, CTT3, CPT1, CPT2 y CPT3). Previamente, otros autores (Briones-Labarca *et al.*, 2011a) observaron un menor contenido de proteína en muestras de manzanas Granny Smith sometidas a presiones de 500 MPa. Las causas que pudieron provocar la disminución en el contenido de proteínas en las muestras presurizadas no están del todo claras, aunque podría ser debido al efecto concomitante de la presión con el incremento de humedad. De hecho, en las muestras CT y tratadas con altas presiones se observó un incremento del 92 % en el contenido de humedad. Se podría plantear la hipótesis que la presión causa cambios conformacionales asociados a la desnaturalización de las proteínas, incluyendo desdoblamiento de las proteínas, agregación y formación de estructuras de gel por la introducción de agua, afectando así a la hidratación de las proteínas (Rastogi *et al.*, 2007). No obstante, la bibliografía encontrada sobre el efecto de las altas presiones en el contenido de proteína en diferentes vegetales es controvertida (Briones Labarca *et al.*, 2011a, 2011b).

Aunque hasta el momento los efectos de las altas presiones en el contenido mineral de productos vegetales no ha sido examinado con detalle (Briones-Labarca *et al.*, 2011a; Barret y Lloyd, 2012); moléculas pequeñas como compuestos volátiles, pigmentos, vitaminas y otros compuestos relacionados con la calidad sensorial y nutricional así como con las propiedades beneficiosas para la salud podrían permanecer inalteradas por las presiones. Con la finalidad de estudiar el efecto de las altas presiones en el contenido mineral de las cebollas, se evaluaron los efectos de los diferentes tratamientos en los minerales mayoritarios. Los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral sugirieron que la combinación de altas presiones con la liofilización no afectó a los niveles de Ca, Fe, Mg y Se. Sin embargo, se observó una disminución de los niveles de K y Na en las muestras sometidas a una presión de 600 MPa (T3) en muestras CT y CP, sugiriendo que las altas presiones tienen un efecto similar en estos dos metales alcalinos con baja ionización.

Al evaluar el efecto del proceso de la liofilización en el contenido de cenizas, se observó que dicho contenido se mantenía estable en las diferentes muestras de cebolla. Sin embargo, se produjeron pérdidas notorias en cuanto al contenido de cenizas en las muestras CTT3 y CPT3. Dicha disminución puede estar relacionada con la disminución de dos de los minerales más abundantes, K y P. De hecho, se encontró una correlación positiva entre el contenido de K, P y el contenido de cenizas ($R=0,704$ y $R=0,814$, respectivamente). Sin embargo, Briones-Labarca *et al.* (2011a) no encontraron diferencias significativas en el

contenido de cenizas en muestras de manzana Granny Smith no tratada y tratada con altas presiones (500 MPa/10 min).

Para finalizar la caracterización de la composición nutricional de la cebolla procesada, se evaluó el efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en el contenido de ácido ascórbico y vitamina C, no observándose cambios notables a ningún nivel de presión aplicada. Así lo ratifican otros estudios que encontraron retención de vitamina C durante la aplicación de las altas presiones en diferentes alimentos, indicando que la vitamina C se mantuvo relativamente estable con las altas presiones, pese a que otros estudios han demostrado que las altas presiones pueden afectar al contenido de vitamina C debido a la posible oxidación acelerada por el calentamiento adiabático. Curiosamente, en el caso del ácido ascórbico y el contenido total de vitamina C se observaron valores significativamente elevados en todas las muestras CP en comparación con las muestras CT, sugiriendo que la liofilización favorece su extracción.

5.1.2. Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de compuestos volátiles, entre ellos polisulfuros

El aroma de un alimento se determina por la detección de compuestos volátiles que escapan de la matriz alimentaria y están presentes en el espacio de cabeza del alimento. Los compuestos volátiles pueden ser liberados al espacio de cabeza a diferentes concentraciones sujeto a su solubilidad en la matriz, la cantidad absoluta y la volatilidad. Así pues, en esta Tesis Doctoral se evaluaron los compuestos volátiles de cebolla por HS GC-MS utilizando el modo SCAN para la identificación y con el fin de cuantificar algunos compuestos específicos con mayor sensibilidad se operó adicionalmente en modo SIM.

Estos métodos se utilizaron para evaluar el efecto de las altas presiones en los compuestos volátiles de cebolla, entre ellos los sulfuros, como parte de los compuestos responsables de la actividad biológica de la cebolla. Además, con el objetivo de seleccionar el proceso más adecuado para una mejor retención de los compuestos volátiles, se estudiaron las diferencias entre las muestras CT, CL y CP.

Primero se identificaron y semicuantificaron los compuestos volátiles utilizando el modo SCAN. En la fracción volátil de cebolla fresca se identificaron un total de 18 compuestos, en los cuales se evaluó el efecto entre los grupos y el tratamiento en cada uno de los compuestos mediante un ANOVA factorial de dos vías.

En términos generales se pudo destacar que para los siguientes compuestos, 2-metil-2-butenal, 2-metil-2-pental, 3,4-dimetiltiofeno, metil 1-propenil disulfuro, metil propil trisulfuro y caprilato de etilo se observó un mayor efecto considerando el grupo (CT, CL y CP) en comparación con el efecto por tratamiento (T0, T1, T2 y T3). En los citados compuestos, se observó un incremento en muestras CL y CP en comparación con CT, independientemente del tratamiento con altas presiones. Por otro lado, se observó una disminución en la concentración de dipropil disulfuro en muestras de cebolla CP y CL.

En cambio, en el caso del hexanal y el 2-pentil furano hubo un mayor efecto por tratamiento en comparación con el efecto por grupo. Cabe mencionar que, en el caso del tioacetato de propilo, aunque el efecto por grupo no fue estadísticamente significativo ni hubo efecto por tratamiento, el efecto de la interacción fue estadísticamente significativo, pero muy bajo.

La mayor concentración total de compuestos volátiles en muestras del tipo CT (sólo APH) se observó en las muestras CTT0, donde los compuestos mayoritarios fueron: dipropil disulfuro (48 %), propionaldehído (25 %), trans-propenil propil disulfuro (6 %) y dipropil trisulfuro (4 %). Los compuestos más abundantes en la cebolla CLT0 – propionaldehído y el dipropil disulfuro– presentaban un porcentaje de área relativa del 57 % y del 16 %, respectivamente. En las muestras CPT0, los compuestos mayoritarios fueron el propionaldehído (50 %), dipropil disulfuro (29 %) y el 3,4-dimetiltiofeno (13 %).

Al evaluar el efecto de las altas presiones en cada uno de los grupos, se observó que en el grupo de muestras CT, en general las altas presiones produjeron una disminución en el contenido de los siguientes compuestos volátiles: propionaldehído, 3,4-dimetiltiofeno, metil propil disulfuro, metil 1 propenil disulfuro, dimetil trisulfuro, 2-pentil furan, dipropil disulfuro, metil propil trisulfuro y dipropil trisulfuro.

Sin embargo, en el grupo de muestras CL (APH y liofilización), el contenido total de compuestos volátiles aumentó notablemente en aquellas muestras que habían sido sometidas a un tratamiento con altas presiones. El contenido de hexanal incrementó significativamente a presiones de 400 MPa (CLT2) y 600 MPa (CLT3) en comparación con las muestras CLT0. Además, a niveles de presión de 600 MPa (T3) se produjo un notable incremento de 1-propanotiol, 2-pentil furano, y dipropil disulfuro. Sin embargo, los diferentes niveles de presión no afectaron a la concentración de metil 2-propenil disulfuro, metil propil disulfuro y metil propil trisulfuro, aunque aumentaron notablemente los niveles de metil 1-propenil

disulfuro y dimetil trisulfuro.

La fracción total de compuestos volátiles disminuyó significativamente en las muestras CP (APH, liofilización y pulverización), siendo mucho más marcado a presiones de 600 MPa (CPT3). Las pérdidas fueron mucho más pronunciadas en aquellos compuestos que contienen un grupo metilo con la adición de un grupo propilo o propenilo y también los que contienen un enlace di/trisulfuro, como el metil 2-propenil disulfuro, metil propil disulfuro, trans-propenil propil disulfuro y metil propil trisulfuro. Además, el dipropil disulfuro y 3,4-dimetiltiofeno presentaron un patrón similar, mientras que el dimetil trisulfuro aumentó en muestras CPT2.

Con la finalidad de cuantificar algunos compuestos, previamente identificados y semicuantificados, con una mayor sensibilidad y corroborar los efectos del grupo y tratamiento, se utilizó el modo SIM. Así, se identificaron y cuantificaron algunos aldehídos abundantes como el propionaldehído, hexanal y 2-metil-2-pentanal; y también algunos sulfuros mayoritarios y que sufrieron notables cambios debido a los efectos del tratamiento y grupo como el 1-propanotiol, tioacetato de propilo, dimetil trisulfuro, dipropil disulfuro, metil propil trisulfuro y dipropil trisulfuro.

Respecto a la cuantificación realizada en el modo SIM de los diferentes compuestos de la fracción volátil, se observó una interacción estadísticamente significativa ($P < 0,001$) en todos los compuestos, a excepción del 2-metil-2-pentenal y del tioacetato de propilo. Además, se observaron diferencias significativas entre grupos y tratamientos para todos los compuestos, siendo el efecto del grupo mucho más marcado. Independientemente del tipo de tratamiento con altas presiones aplicado, en las muestras CL y CP se observó un incremento de 2-metil-2-pentenal, dimetil trisulfuro y metil propil trisulfuro en comparación con las muestras CT. Estos resultados coinciden en gran medida con los resultados obtenidos por Mondy *et al.* (2002), quienes encontraron la presencia de 2-metil-2-pentenal, el principal compuesto de degradación del factor lacrimógeno (sulfóxido de triopropanal) y un aumento significativo de los trisulfuros en cebolla liofilizada en comparación con cebolla congelada. Además, el dimetil disulfuro y 2-metil-2-pentenal incrementaron en cebolla liofilizada en comparación con la cebolla fresca (Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, se observó una disminución del propionaldehído, 1-propanotiol, hexanal, dipropil disulfuro y dipropil trisulfuro en las muestras CL y CP en comparación con las muestras CT, independientemente del tratamiento al que fueran sometidas, mostrando claramente que los

procesos de liofilizado y pulverizado afectaron a la estabilidad de dichos compuestos.

Asimismo, se observó una correlación positiva ($R=0,918$, $P<0,001$) entre la concentración de dipropil disulfuro y dipropil trisulfuro, entre cebolla troceada, liofilizada y pulverizada. Estudios previos (Bakr y Garwish, 1998), encontraron disminuciones notables en las áreas de los picos de los compuestos mayoritarios de la cebolla –propanotiol, propionaldehído, dipropil disulfuro y metil 1-propenil disulfuro– como consecuencia del proceso de secado, especialmente con el sistema eléctrico de secado por vacío, probablemente debido a la inestabilidad provocada en estos compuestos por el calentamiento. Además, Kim *et al.* (2005) encontraron una visible disminución en la concentración de 1-propanotiol y dipropil trisulfuro en cebolla liofilizada en comparación con cebolla fresca. En este sentido, Yu-Tao *et al.* (2010) expusieron que el proceso de liofilización por vacío parece el método de secado más óptimo o menos perjudicial en términos de retención de compuestos volátiles de cebolla en comparación con el secado con aire caliente.

Se considera que el sabor y aroma natural de frutas y verduras no se ve alterado por los tratamientos con altas presiones ya que la estructura química de las moléculas de pequeño tamaño responsables del sabor y aroma no se ve afectada directamente por las altas presiones (Oey *et al.*, 2008). Hecho que se ha observado en numerosos estudios (Lambert *et al.*, 1999; Sumitani *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1993; Fernández García *et al.*, 2001; Daoudi *et al.*, 2002). En este sentido, Butz *et al.* (1994) mostraron que la concentración global de los compuestos aromáticos de la cebolla no se veía afectada después de ser sometidos a tratamientos de 300 MPa/30 min/25 °C. Sin embargo, el procesado con altas presiones puede alterar indirectamente el contenido de algunos compuestos responsables del aroma, potenciando o ralentizando reacciones enzimáticas y químicas. En la fracción volátil de las muestras CT el compuesto mayoritario fue el dipropil disulfuro, el cual representaba el 53 % del total de compuestos identificados en las muestras CTT0, resultados que concuerdan con los obtenidos por Kallio y Salorinne (1990). Sin embargo, Schulz *et al.* (1998) detectaron que los compuestos mayoritarios en aceite de cebolla de diferentes variedades fueron el 2-metil-2-pentenal, metil 1-propenil disulfuro, metil propil trisulfuro y propanotiol, lo que indica claramente diferencias en la composición debido a los antecedentes genéticos.

En el presente estudio, es de destacar que los tratamientos con altas presiones en las muestras CT produjeron un incremento en las concentraciones de dipropil disulfuro (T1), metil propil trisulfuro (T1 y T2) y dipropil trisulfuro que iban del 17 al 30 % aproximadamente, en comparación con la cebolla CTT0, sugiriendo que el tratamiento con altas presiones produjo una liberación de enzimas, incluyendo aliinasa, influyendo en las reacciones bioquímicas y dando lugar a cambios en el sabor de la cebolla. Sin embargo, en este sentido, Butz *et al.* (1994) observaron una disminución significativa en la concentración de dipropil disulfuro en muestras de cebolla después de un tratamiento a 300 MPa/25 °C/30 min, no obstante la distinta duración del tratamiento puede ser una razón de la mencionada discrepancia en los resultados.

En referencia a otros compuestos en las muestras CT, el dipropil trisulfuro, que representa el 29 % del total de compuestos identificados, constituyó el segundo compuesto mayoritario en la fracción volátil de las muestras CTT0. La concentración de dipropil trisulfuro se vio afectada en función de los tratamientos a los que fue sometida la muestra, por un lado en muestras CTT3 disminuyó considerablemente, por otro lado, aumentó notablemente (30 %) en las muestras CTT1, pero se mantuvo constante en las muestras CTT2, sugiriendo que la pérdida de este compuesto fue dependiente de la presión.

Los resultados en la presente Tesis Doctoral indican que los tratamientos con altas presiones no afectaron significativamente los niveles de 1-propanotiol, 2-metil-2-pentenal y tioacetato de propilo. A diferencia de este resultado, Butz *et al.* (1994) encontraron un aumento en 2-metil-2-pentenal en cebolla sometida a 300 MPa/25 °C/30 min. Esta diferencia puede ser debida a que las muestras en el presente estudio fueron congeladas inmediatamente después de ser tratadas con altas presiones y como consecuencia algunas reacciones enzimáticas fueron ralentizadas, incluyendo la actividad de la aldolasa que es liberada después de la lesión celular.

La concentración total de compuestos volátiles en las muestras CL (APH y liofilización) se mantuvo en muestras presurizadas a 200 MPa (CLT1) en comparación con las muestras no tratadas (CLT0), mientras que se observó una ligera disminución del 12 y 13 % en muestras sometidas a 400 y 600 MPa (CLT2 y CLT3), respectivamente. Al comparar el contenido del dipropil trisulfuro en las muestras CLT0 y en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos con altas presiones, se observaron pérdidas importantes en las muestras CLT2 (68 %) y CLT3 (47 %). El metil propil trisulfuro

presentó el mismo patrón, mostrando reducciones en los diferentes tratamientos. En el caso del dipropil disulfuro, el tratamiento con altas presiones produjo aumentos estadísticamente significativos del orden del 24 % en las muestras CLT2 y del 52-53 % en CLT1 y CLT3. Los niveles de propionaldehído y dimetil trisulfuro fueron más elevados en muestras sometidas a 200 MPa (T1) y a 400 MPa (T2). Además, los niveles de dimetil trisulfuro aumentaron del 34 % al 154 % en las muestras CLT1 y CLT2, respectivamente, aunque los otros dos trisulfuros analizados disminuyeron con la presión. Mondy *et al.* (2002) obtuvieron un incremento significativo de trisulfuros en cebolla liofilizada en comparación con cebolla congelada. En concordancia con los resultados observados con el modo SCAN, el contenido de hexanal incrementó significativamente en las muestras CLT3, pero se observó una clara tendencia a la baja del 2-metil-2-pentenal.

Además, se encontró una correlación negativa entre el 2-metil-2-pentenal y el hexanal entre las muestras CT, CL y CP, indicando que el incremento de hexanal en los tratamientos con altas presiones podría estar relacionado con la disminución de 2-metil-2-pentenal. Los cambios encontrados en estos compuestos en muestras CP fueron los mismos que los observados en muestras CL, sugiriendo que la liofilización es la responsable de dichos cambios, mientras que la pulverización no afectó a estos compuestos. Parece ser que la pulverización produce una reducción general en el contenido de compuestos volátiles en las muestras T0 en comparación con las muestras CL cuyo contenido se mantuvo a lo largo del procesado con altas presiones. En cuanto al incremento de hexanal, otros autores han demostrado que la formación de hexanal por la oxidación de lípidos de ácido linoleico se ve reforzada por el tratamiento a presión, observándose resultados similares en el puré de fresa presurizado a 400 MPa/temperatura ambiente/20 min) (Navarro *et al.*, 2002), y un incremento del 40 % del hexanal en cebolla tratada a 300 MPa/25 °C/30 min (Butz *et al.*, 1994). En este sentido, Viljanen *et al.* (2011) mostraron que tratamientos de altas presiones a temperatura ambiente incrementaron los niveles de hexanal, heptanal y octanal de puré de tomates cherry. Asimismo, un estudio previo mostró que la cantidad de hexanal se incrementa durante los tratamientos por altas presiones en zumo de tomate (500 MPa, 3 min) debido a la autooxidación lipídica y las reacciones de oxidación enzimática (Porretta *et al.*, 1995).

5.1.3. Evaluación del efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y liofilización en la concentración de flavonoles

Las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas de la cebolla han sido atribuidas en gran medida a la presencia de polifenoles (Kim y Park, 2010; Marzocchella *et al.*, 2011). Según se ha mencionado previamente, el consumo de ciertos compuestos presentes en la dieta, como son los flavonoides, está relacionado con una disminución en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y en la patogénesis de varias enfermedades donde el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios juegan un papel importante. Muchos estudios han demostrado que la aplicación de las altas presiones en productos vegetales puede modificar los compuestos bioactivos o su extractabilidad, bioaccesibilidad y funcionalidad (Butz *et al.*, 2002; González *et al.*, 2010a; González *et al.*, 2010b; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b). Por otro lado, el proceso de liofilización es reconocido como uno de los mejores procesos de secado para mantener las características nutricionales y los compuestos responsables de las propiedades saludables. Así pues, en la presente Tesis Doctoral también se han evaluado los cambios en el contenido de compuestos fenólicos de la cebolla sometida a tratamientos con altas presiones y en la cebolla sometida a tratamientos con altas presiones combinados con un proceso de liofilización y pulverización.

Se determinó el contenido de fenoles totales en las muestras CT y en las muestras CP, tanto sin tratar (T0) como las que habían sido sometidas a los diferentes tratamientos con altas presiones (T1, T2, T3). El análisis de compuestos fenólicos se realizó en extractos de cebolla no hidrolizados y en extractos hidrolizados. El mayor contenido de fenoles totales en las muestras no hidrolizadas se observó en las muestras CTT2 (400 MPa), mientras que el contenido de fenoles totales disminuyó significativamente en las muestras CTT1 y CTT3 (200 y 600 MPa). Sin embargo, en los extractos hidrolizados se observó un efecto opuesto, mostrando una disminución significativa en las muestras CTT2, mientras que la concentración de fenoles totales en las muestras CTT1 y CTT3 no se vio afectada. Únicamente en los extractos de muestras CPT1 hidrolizadas se obtuvo una mejora del contenido de fenoles totales, sugiriendo que la combinación de tratamientos con altas presiones y liofilización favorece la extracción del contenido de fenoles totales. Estudios previos muestran un incremento aproximado del 12 % en el contenido de fenoles totales a presiones de 100 y 400 MPa combinado con altas (50 °C) y con bajas (5 °C) temperaturas,

respectivamente (Roldán-Marín *et al.*, 2009b). Butz *et al.* (1994) mostraron que tratamientos por encima de los 100 MPa inducen el pardeamiento de los trozos de cebolla debido a reacciones enzimáticas de pardeamiento involucrando polifenoloxidasas, lo que podría explicar la reducción en el contenido de fenoles totales encontrada en algunos casos en el presente estudio.

Se identificaron un total de ocho flavonoles, siendo los dos flavonoles mayoritarios presentes en las muestras de cebolla la quercetina 3,4'-diglucósido (Q3,4G) y la quercetina 4'-glucósido (Q4G). El resto de flavonoles detectados fueron la quercetina 3,7,4'-triglucósido (Q3,7,4G), quercetina 7,4'-diglucósido (Q7,4G), quercetina 3-glucósido (Q3G), isorhamnetina 3,4'-diglucósido (I3,4G), e isorhamnetina 4'-glucósido (I4G), representando alrededor del 10 % de la concentración total de los flavonoles identificados.

En las muestras CTT0 no hidrolizadas, la Q3,4G fue el flavonol mayoritario, representando aproximadamente el 65 % del contenido de flavonoles totales. La combinación de los diferentes tratamientos con altas presiones junto con los procesos de liofilización y pulverización produjo un incremento en el contenido de Q3,4G siendo éste del 29,7 % en muestras sometidas a presiones de 200 MPa (CPT1) y del 33,8 % en aquellas que habían sido sometidas a presiones de 600 MPa (CPT3) en comparación con las muestras CPT0. El segundo compuesto mayoritario en las muestras CTT0 fue la Q4G, representando el 26 % del contenido de flavonoles totales, dicho compuesto no se vio afectado en las muestras CTT1 y CTT2, pero se produjo una disminución significativa en las muestras CTT3. Sin embargo, el contenido de Q4G incrementó del orden del 69,6 % y del 63,2 % en las muestras CPT2 y CPT3, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados apuntan a que en la cebolla tratada con altas presiones, liofilizada y pulverizada aumentó la extractabilidad de Q4G y Q3,4G sin afectar la concentración de quercetina, tal y como sugirió otro estudio (Roldan-Marín *et al.*, 2009b).

La cuantificación de las agliconas de quercetina e isorhamnetina solo fue viable en los extractos hidrolizados al ser dicho contenido no cuantificable en las muestras no hidrolizadas. La concentración de quercetina no se vio afectada por los diferentes tratamientos con altas presiones, aunque es de destacar que independientemente del nivel de presión aplicado, en las muestras CP el contenido de quercetina fue menor que en las muestras CT. Estos resultados están en concordancia con el contenido de fenoles totales determinado en este estudio, indicando que la liofilización produce pérdidas en el contenido

de quercetina.

Referente al contenido de isorhamnetina, las muestras CT sometidas a los diferentes tratamientos con altas presiones mantuvieron concentraciones prácticamente iguales a las muestras no tratadas (T0). No obstante, en las muestras CPT2 y CPT3 la concentración de isorhamnetina aumentó significativamente en comparación con las muestras CPT0. Al comparar las muestras CT con las CP sometidas al mismo tratamiento se observó una pérdida significativa de isorhamnetina en cebolla CPT0, y tratada a 200 y 400 MPa (T1 y T2), siendo menos pronunciada a mayor presión, sugiriendo que las altas presiones previnieron las pérdidas producidas por la liofilización y la pulverización.

El incremento en el contenido fenólico observado en muestras tratadas con altas presiones, liofilizadas y pulverizadas (CPT1, CPT2 y CPT3) puede ser debido a la disrupción de las vacuolas vegetativas de la cebolla donde están contenidos los compuestos fenólicos. Otra hipótesis puede ser que las altas presiones pueden ayudar a la extracción de polifenoles unidos a la membrana celular (Roldán-Marín *et al.*, 2009b; De Ancos *et al.*, 2000; De Ancos *et al.*, 2002). Además, habría que tener en cuenta que las altas presiones podrían causar cambios estructurales en las matrices alimentarias afectando a la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.

5.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de extractos de cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización

La cebolla presenta una compleja composición química y bioquímica, considerada como una fuente de flavonoides, compuestos sulfurados, fructooligosacáridos y fibra (Benítez *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Marzocchella *et al.*, 2011) con propiedades antioxidantes (Lu *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2007; Shim *et al.*, 2011) y antiinflamatorias (Mohammadi-Motlagh *et al.*, 2011; Wilson, 2007). Teniendo en cuenta que la inflamación y la oxidación juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, con el **segundo objetivo** se determinaron dichas actividades en la cebolla tratada con altas presiones y la cebolla tratada con altas presiones, liofilizada y pulverizada.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* de la cebolla se evaluó mediante la medida de la capacidad de inhibición de la actividad hialuronidasa. Los resultados sugirieron que la

combinación de las altas presiones con un proceso de liofilización, independientemente del nivel de presión aplicado, no favorece la capacidad antihialuronidasa, dado que se observó una disminución significativa de aproximadamente el 48 % en muestras troceadas y presurizadas (CTT1, CTT2 y CTT3). Además, en las muestras CP también se observaron pérdidas en los tres niveles de presión, aunque la reducción fue significativa solo en las muestras CPT3 (600 MPa).

Con el objetivo de explicar los efectos de la cebolla procesada en la inhibición de la actividad hialuronidasa, se evaluó la capacidad antihialuronidasa de la quercetina y de los derivados de quercetina, los cuales son en parte responsables de dicha actividad (Kuppusamy *et al.*, 1990). La actividad hialuronidasa fue inhibida en un 27 % por la quercetina y un 38 % por la Q3,4G a 750 μ M. Además, se observó una correlación positiva entre los contenidos de quercetina e isorhamnetina y la inhibición de la actividad hialuronidasa en CT y CP. Actualmente, se sabe que ciertos tipos de flavonoides muestran una buena actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación inducida, e incluso como agentes antiescleróticos (Tribolo *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010). Aun así, es importante tener en cuenta que el potencial antiinflamatorio de los extractos de cebolla no es exclusivamente debido a los flavonoides, también depende de los niveles de otros compuestos que pueden ser igualmente modificados por los tratamientos con altas presiones, así como por los subsiguientes procesos de liofilizado y pulverizado. En la capacidad antihialuronidasa se observó un efecto notable tanto para los efectos principales (grupo y tratamiento) como para el efecto de la interacción (grupo por tratamiento). La liofilización y la pulverización presentaron un efecto significativo en la actividad antihialuronidasa ($F=1227,524$, $P<0.001$) en comparación con el tratamiento ($F=15,362$, $P<0.001$).

Se cree que los constituyentes fenólicos presentes en la cebolla pueden contribuir a regular las respuestas inflamatorias mediante la reducción de especies reactivas de nitrógeno. En la presente Tesis Doctoral se evaluó la capacidad de captación de radicales libres del óxido nítrico. Los extractos obtenidos de las muestras presurizadas mostraban una mayor capacidad de captación de radicales libres de NO \cdot en comparación con las muestras no presurizadas. Respecto a los extractos de cebolla no hidrolizados y los hidrolizados, las altas presiones tuvieron un efecto significativo, incrementando el NO \cdot capturado para tratamientos de 200 y 400 MPa (T1 y T2) en muestras CT y CP.

Estos resultados confirman que los extractos obtenidos de cebolla sometida a

tratamientos de altas presiones son capaces de establecer una relación competitiva con el oxígeno, reaccionando con el NO generando nitroprusiato de sodio, presente en el ensayo. Además, muestran que la combinación de las altas presiones con la liofilización y la pulverización no modificó el efecto de las altas presiones en el potencial secuestrante de NO[•]. Un estudio reciente refuerza la hipótesis sobre la relación de las respuestas antioxidantes y antiinflamatorias con el marcado efecto antiaterogénico producido por el extracto de cebolla en ratas ateroscleróticas (Li *et al.*, 2011).

Para la correcta evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se utilizaron cuatro métodos por sus diferencias en términos de mecanismos de reacción, oxidación y en especies reactivas: capacidad de secuestro de radicales libres [método de la medida del secuestro del radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) y método de la medida del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•])]. Además de la medida de la capacidad de reducción férrica [FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)] y la medida de la capacidad antioxidante por fotoquimioluminiscencia (PCL).

Los resultados con el método de la medida del secuestro del radical ABTS^{•+} sugirieron un efecto positivo en la combinación de altas presiones y liofilización en los extractos no hidrolizados, mostrando una actividad significativamente mayor que en las muestras CT. El ANOVA de dos vías reveló efectos similares para el grupo ($F=48,241$) y el tratamiento ($F=46,312$), así como una interacción significativa entre grupo y tratamiento ($F=28,906$, $P<0,001$).

En los extractos hidrolizados, la actividad antioxidante determinada por ABTS^{•+} incrementó un 31 % en las muestras CTT2, sin embargo dicha actividad disminuyó en las muestras CPT1 y CPT3. El ANOVA de dos vías mostró que el efecto por grupo ($F=924,16$, $P<0,001$) fue más elevado que el efecto por tratamiento ($F=73,883$, $P<0,001$), de acuerdo con los altos valores encontrados en las muestras CT en comparación con las muestras CP en cada tratamiento. Estos hallazgos en cebolla procesada apoyan la teoría que las modificaciones en la actividad pueden ser dependientes de la matriz y de los parámetros del procesado. Se podría decir que las altas presiones y las altas presiones en combinación con la liofilización y la pulverización pueden modificar la extractabilidad de los compuestos bioactivos, y como resultado dar lugar a pequeñas diferencias en la actividad antioxidante (sobre todo en fracciones solubles) (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b).

Al igual que en los resultados obtenidos por el método del ABTS^{•+}, los datos

obtenidos con el método DPPH[•] indican un efecto positivo en la actividad antioxidante en la combinación de altas presiones y liofilización. En esta ocasión, en los extractos no hidrolizados los valores obtenidos por el método del DPPH[•] aumentaron en las muestras CPT1. Sin embargo, en los extractos hidrolizados el efecto de las altas presiones en la actividad antioxidante determinada por el ensayo DPPH[•] mostró que todos los tratamientos con altas presiones mantuvieron los mismos niveles de actividad antioxidante que las muestras T0, en muestras CT y en las CP, a excepción de las muestras troceadas y tratadas a 600 MPa (CTT3), las cuales mostraron una ligera reducción. Al realizar el ANOVA de dos vías, se observó un mayor efecto del grupo ($F=1815,606$, $P<0,001$) en comparación con el efecto del tratamiento ($F=5,357$, $P<0,004$) al igual que sucedía con el método del ABTS^{•+}.

Los efectos de las altas presiones en alimentos sólidos han sido poco estudiados, sin embargo, Butz *et al.* (2002) mostraron importantes cambios cualitativos en zanahorias y tomates tratados a 500 y 800 MPa, donde la actividad antioxidante sufría una pequeña disminución. Igualmente, en otro trabajo reciente, se estudiaron los efectos de las altas presiones a 500 MPa en la actividad antioxidante en manzanas Granny Smith donde se reflejó un efecto notable en la actividad secuestrante del radical DPPH[•] en muestras digeridas y no digeridas, dependiendo del tiempo de exposición (Briones-Labarca, *et al.*, 2011a).

Respecto a los resultados obtenidos por el método FRAP en extractos no hidrolizados, las altas presiones tuvieron un claro efecto diferencial en cebolla troceada y pulverizada. En las muestras CT la actividad antioxidante disminuyó significativamente en los tres niveles de presión aplicados, mientras que en las muestras CP se observó un incremento en la actividad antioxidante en las muestras CPT1 y CPT2, sugiriendo un efecto positivo de la combinación de las altas presiones y la liofilización. En concordancia con el análisis ANOVA de dos vías cuyos resultados apoyan que el tratamiento con altas presiones es el factor principal que modifica dicho poder reductor ($F=81,00$, $P<0,001$). En el estudio realizado por McNermey *et al.* (2007) las altas presiones presentaron efectos diferenciales en la actividad antioxidante medida con el método FRAP dependiendo del tipo de vegetal, reconociendo las características de la matriz alimentaria y la composición de los nutrientes como factores críticos que influyen en los valores de la actividad antioxidante.

El cuarto método utilizado para determinar la actividad antioxidante de las diferentes muestras de cebolla fue la medida por fotoquimioluminiscencia-PCL tanto para sustancias

hidrosolubles (ACW-Antioxidant Capacity in Water-soluble substances) como para sustancias liposolubles (ACL-Antioxidant Capacity in Lipid-soluble substances). En el caso de las muestras no hidrolizadas se observaron algunas diferencias en la actividad antioxidante medida por el método PCL-ACL. En las muestras CTT1 y CTT3 se observó una reducción significativa, mientras que en las muestras CPT2 la actividad antioxidante incrementó en un 47,3 %. Del mismo modo, el ANOVA de dos vías para el ensayo PCL-ACL indicó que los efectos del grupo ($F=108,504$), tratamiento ($F=28,500$) y el efecto de la interacción ($F=16,361$) fueron significativos, enfatizando la influencia del grupo.

La medida de la actividad antioxidante por el ensayo PCL-ACL en extractos hidrolizados reveló que solo las muestras CTT1 y CTT2 experimentaron un incremento significativo (~20,1 %), mientras que no se produjo ningún efecto en muestras CPT1, CPT2 y CPT3, también en concordancia con el ANOVA de dos vías que mostró un mayor efecto para el grupo.

Los resultados en este estudio muestran correlaciones estadísticamente significativas entre los contenidos de los glucósidos de flavonoles y los valores de la actividad antioxidante. El contenido de Q4G correlacionó positivamente con los valores de ABTS^{•+}, FRAP, PLC-ACL. Los contenidos de Q3,4G e I4G correlacionaron significativamente con los valores de FRAP, mientras que las correlaciones entre el contenido de Q3G, Q3,4G, Q7,4G, e I4G y los valores de ABTS^{•+} fueron más débiles pero significativas. Estos resultados son consistentes con los resultados encontrados en otros estudios (McInerney *et al.*, 2007; Santas *et al.*, 2008; Zielinska *et al.*, 2008 y Rice-Evans *et al.*, 1996), que apuntaban el papel desempeñado por el contenido fenólico y los flavonoides en la prevención de la oxidación, indicando la presencia de grupos funcionales, como el hidroxilo, en la estructura fenólica como responsables de dicha actividad. La elevada capacidad para secuestrar radicales libres y especies reactivas que mostraron los extractos hidrolizados se correlacionó con niveles elevados de quercetina. De hecho, en el presente estudio se mostró que tanto el contenido de quercetina como de fenoles totales de los extractos hidrolizados, presentaron correlaciones más fuertes con la actividad antioxidante y antiinflamatoria que los extractos no hidrolizados, apuntando, de acuerdo a la bibliografía, que la quercetina es uno de los más potentes secuestradores de ROS dentro de la familia de flavonoides debido a su estructura molecular. Además, el efecto de las altas presiones en el contenido de quercetina de los alimentos es muy destacable, ya que los mecanismos hidrolíticos están involucrados en la liberación de la forma aglicona, que entra en el

enterocito antes del paso de los metabolitos en el sistema circulatorio. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio se ha confirmado que el contenido de agliconas y la actividad antioxidante de los extractos hidrolizados no se vieron afectadas por los tratamientos con altas presiones. Además, se observó una correlación positiva entre los valores de la capacidad de secuestrar NO[•] y los valores de actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidrolizados, reforzando la relación cercana entre inflamación y oxidación.

La completa consecución de los Objetivos 1 y 2 de la presente Tesis Doctoral permitió seleccionar el tratamiento de alta presión hidrostática a 400 MPa/25 °C/5 min (T2) como tratamiento que más favoreció la extracción de compuestos bioactivos de la cebolla, así como el tratamiento que dio lugar a mejores resultados en cuanto a actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*. Por tanto, partiendo de estos resultados, se preparó el ingrediente funcional de cebolla necesario para llevar a cabo la elaboración de las dietas de las ratas, para la consecución del Objetivo 3 de la Tesis Doctoral.

5.3. Evaluación de los efectos de la cebolla procesada por alta presión hidrostática combinada con un proceso de liofilización como ingrediente funcional en la actividad antiinflamatoria, antioxidante e hipocolesterolémica, los biomarcadores de riesgo cardiovascular y el perfil de ácidos grasos en ratas Wistar hipercolesterolémicas

La hipercolesterolemia es uno de los mayores factores de riesgo para las patologías cardiovasculares, entre ellas aterosclerosis y disfunción endotelial. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que compuestos presentes en la cebolla, como los flavonoides y los compuestos organosulfurados están relacionados con su actividad antioxidante, antiinflamatoria e hipocolesterolémica (Bok *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Peluso, 2006; Rehrah, 2007). Así pues, con el **tercer objetivo** se pretendió determinar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria e hipolipidémica *in vivo* de la cebolla procesada por alta presión hidrostática como ingrediente funcional y sus efectos en los biomarcadores de riesgo cardiovascular y el perfil lipídico en ratas Wistar hipercolesterolémicas.

En el presente estudio se confirmó que suministrar dietas ricas en colesterol a ratas Wistar durante siete semanas produce hipercolesterolemia, estrés oxidativo, inflamación y

hepatotoxicidad. Mientras que alimentar a las ratas con dietas ricas en colesterol y enriquecidas con cebolla dio lugar a una mejora significativa en la hepatotoxicidad, disminuyendo el estrés oxidativo y modulando la inflamación.

Se ha demostrado que dietas ricas en colesterol inducen a hepatotoxicidad a través de alteraciones en el perfil de las enzimas hepáticas como son ALT/GPT, AST/GOT, las cuales se utilizan para determinar la disfunción hepática y la hepatotoxicidad (Uzun *et al.*, 2013; Khaled *et al.*, 2012; Alkhamees, 2013; Chtourou *et al.*, 2015). Los niveles elevados de ALT y AST en el grupo HC, reflejaron el desarrollo progresivo de la lesión hepática aguda causada por la alta ingesta de colesterol. Sin embargo, en el grupo HCO los datos apuntaron a un efecto hepatoprotector provocado por la ingesta y la metabolización de la cebolla en polvo, incluso estando en condiciones de hipercolesterolemia. Apoyando estos resultados, otros estudios han mostrado el efecto hepatoprotector de compuestos bioactivos de diferentes materiales vegetales (Lin *et al.*, 2014; Maksoud *et al.*, 2012; Tokaç *et al.*, 2013).

La hipercolesterolemia también conduce a una mayor acumulación de colesterol en las células, activando la producción de radicales libres de oxígeno y causando estrés oxidativo y consecuentemente modificando múltiples sistemas fisiológicos (Jemai *et al.*, 2008; Umakoshi *et al.*, 2011). Los tejidos biológicos contienen enzimas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) que contribuyen al mecanismo de defensa antioxidante (Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, en condiciones desmesuradas de estrés oxidativo el aumento del sistema de defensa puede no proteger eficazmente frente al daño oxidativo producido por los radicales libres. En términos generales, una reducción de la actividad de dichas enzimas está relacionada con una acumulación extrema de radicales libres reactivos, provocando efectos negativos como la pérdida de la integridad y la función de la membrana celular (Posadas *et al.*, 2009). El consumo del ingrediente de cebolla demostró su efecto frente al estrés oxidativo potenciando la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx en los eritrocitos y en el hígado y además disminuyendo los niveles de proteínas carboniladas. Las proteínas carboniladas son biomarcadores del daño de proteínas causado por residuos de aminoácidos oxidados en condiciones de estrés. En este sentido, los efectos protectores de la cebolla se atribuyeron básicamente a su acción secuestrante de radicales libres (Hyun *et al.*, 2013). Estudios previos donde evaluaron diferentes antioxidantes naturales en ratas hipercolesterolémicas,

como es el caso de la pulpa de açaí, encontraron niveles bajos de proteínas carboniladas (De Souza *et al.*, 2010, Chtourou *et al.*, 2015).

En la presente Tesis Doctoral, cabe destacar que la dieta HC produjo cambios en el estado proinflamatorio y en el estado antiinflamatorio de las ratas Wistar, al observarse una tendencia al alza en las concentraciones de moléculas proinflamatorias como: IFN- γ , IL-1 β , y TNF- α , así como una concentración de la citoquina antiinflamatoria IL-10 significativamente más elevada en el grupo HC en comparación con el grupo C. La función del IFN- γ en la aterosclerosis está bien documentada (Stokes *et al.*, 2002); se ha descrito que las células de las placas ateromatosas humanas contribuyen a una mayor secreción de citoquinas secretadas por los linfocitos Th1, como por ejemplo el IFN- γ , que las citoquinas secretadas por los linfocitos Th2, como el IL-10 (Libby, 2008). Las respuestas de los linfocitos Th1 principalmente amplifican reacciones proinflamatorias mediando la liberación de citoquinas, por ejemplo el IFN- γ , promueve la formación de la placa, y en consecuencia favorece la aterosclerosis (Hansson, 2009; Libby *et al.*, 2009). Además, los niveles de IL-6 y TNF- α en plasma suelen ser elevados en ratas hipercolesterolémicas (Zhang *et al.*, 2012; Chtourou *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2014; Sudhahar *et al.*, 2007). En este estudio se observó una tendencia a la baja de los niveles de IFN- γ , IL-1 β y TNF- α en el grupo HCO en comparación con el grupo HC, lo que podría ser debido al efecto modulador ejercido por los compuestos bioactivos de la cebolla, como la quercetina, capaz de reducir la actividad transcripcional del NF κ B, mediador central de la respuesta inflamatoria (Kleemann *et al.*, 2011).

De hecho en otros estudios, los altos niveles de TNF- α debido a la estimulación por LPS, se regularon al pre-incubar las células HT-29 con extracto de catáfilo externo de cebolla (Overman *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013) mientras que el extracto fistular del tallo de cebolla inhibió varias vías de señalización inflamatorias, reduciendo los niveles de IL-1 β , IL-6, MCP-1 y TNF- α (He *et al.*, 2014). Asimismo, en el presente estudio, los resultados indicaron un aumento de los niveles de IL-10 en plasma en respuesta a la dieta hipercolesterolémica. La presencia de estrés causado por la inflamación ha sido considerada una de las causas del aumento de producción de IL-10 (Asadullah *et al.*, 2003). Por lo tanto, y al ser IL-10 considerada también una potente citoquina antiinflamatoria, dicho aumento podría ser activado para contrarrestar los efectos de los mediadores pro-inflamatorios. Además, se sabe que la IL-10 influye en el metabolismo de lípidos, facilitando tanto la

absorción como la expulsión de colesterol (Han *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2015). Sin embargo, en el grupo HCO se observó una disminución en los niveles de IL-10, lo que podría sugerir o bien el efecto inhibidor del ingrediente de cebolla en los niveles de IL-10, o más probablemente la modulación por la cebolla de los otros mediadores que simultáneamente indujeron una disminución de los niveles de IL-10.

Asimismo, se ha propuesto que el estrés oxidativo, las LDL oxidadas y sus productos de degradación potencian la producción de citoquinas inflamatorias, que a su vez inducen la producción de las moléculas de adhesión –ICAM-1 y sE-selectina– y quimioquinas ateroscleróticas, como la MCP-1, que contribuye al desarrollo de la aterosclerosis (Kato *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2010). En este estudio, las concentraciones de ICAM-1 y sE-selectina incrementaron en el grupo alimentado con la dieta HC en comparación con el grupo que fue alimentado con la dieta HCO. Las modificaciones de ICAM-1 son parte de la respuesta endotelial habitual, mientras que sE-selectina interviene en el equilibrio inicial, secuestro y adhesión de los leucocitos al endotelio (Shirpoor *et al.*, 2012). Por otro lado, los derivados de la quercetina y la isorhamnetina, que son el mayor grupo de flavonoles en la cebolla, tienen un efecto inhibitorio en la expresión de ICAM a través de una disminución de la vía JNK/AP-1 (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2010). Por lo tanto, los altos niveles de s-ICAM en el grupo HC se podrían interpretar como un indicador precoz de los primeros estadios de inflamación y aterosclerosis debido a la dieta hipercolesterolémica (Shirpoor *et al.*, 2012; Stokes *et al.*, 2009; Fotis *et al.*, 2012). La disminución de los niveles de ICAM-1 y de E-selectina en el grupo HCO podría ser por acción del ingrediente de cebolla, que intervendría manteniendo la infiltración de los macrófagos y disminuyendo la progresión del proceso aterosclerótico, indicando mejoras en la función endotelial, y reducirían el riesgo de la enfermedad vascular aterosclerótica (Bakker *et al.*, 2010). De hecho, estudios previos realizados por nuestro grupo confirman que la suplementación con cebolla de la dieta de ratas Wistar hipercolesterolémicas también mejora la reactividad vascular de arterias mesentéricas, medida a través de la respuesta dependiente de endotelio y de la actividad NADPH oxidasa (González-Peña *et al.*, 2014).

MCP-1 es una de las quimioquinas fundamentales que ajustan la migración y la infiltración de monocitos y macrófagos, y presenta una función principal en las lesiones ateroscleróticas (Stoner *et al.*, 2013). En los resultados del presente estudio, los niveles de MCP-1 fueron significativamente menores en el grupo HCO en comparación con el grupo

HC. La disminución de los niveles de MCP-1 en el grupo HCO probablemente pudo ser debida a los efectos atenuantes de las sustancias biológicamente activas de la cebolla. En este sentido, se ha demostrado que el consumo de especies *Allium* es capaz de incrementar la producción de sulfitos de hidrógeno (Li *et al.*, 2011) que a su vez puede bloquear la producción de MCP-1 a través de la disminución de la regulación del NFκB (Benedetti *et al.*, 2014). Asimismo, la sobreexpresión de adiponectina puede ser estimulada por la quercetina, mientras que la elevación de la adiponectina puede contribuir a la reducción de TNF-α, MCP-1 y otras citoquinas por la supresión de la activación de AP-1 y NFκB en los macrófagos y las células de señalización de MAPK (Seo *et al.*, 2015). Por otra parte, mediante el aumento de la adiponectina se ha demostrado que la quercetina mejora la progresión de la esteatosis hepática.

Además, recientes investigaciones han revelado que MCP-1 contribuye en la angiogénesis mediada por VEGF, que incrementa la permeabilidad vascular y estimula la expresión de VEGF (Yamada *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005). Los altos niveles de VEGF encontrados en el grupo HC en el presente estudio estuvieron de acuerdo con Mahmoudabady *et al.* (2015) que observaron niveles altos de VEGF en ratas hipercolesterolémicas y con Heinonen *et al.* (2013) que observaron niveles altos de VEGF en ratas con aterosclerosis. Por otro lado, los compuestos ricos en cisteína presentes de forma natural en la cebolla y otros vegetales del género *Allium* se han considerado compuestos con gran potencial terapéutico en la prevención de las complicaciones microvasculares al influir en la inhibición del VEGF. Así lo ratifican otros estudios, donde compuestos de cisteína, S-etilo cisteína y S-propilo cisteína, actuaron como inhibidores de VEGF en el riñón de ratones diabéticos (Lin y Yin, 2008), y también el trisulfuro de dialil fue capaz de inhibir las características angiogénicas de células endoteliales vasculares humanas de cordón umbilical (HUVECs) (Xiao *et al.*, 2006). La tendencia a la baja de la concentración de VEGF en el grupo HCO en comparación con el grupo HC, sugirió que el ingrediente de cebolla puede reducir de forma eficaz las complicaciones vasculares inducidas por la hipercolesterolemia. Los procesos inflamatorios no están solo asociados con el inicio y la progresión de la aterosclerosis sino que también son responsables de las complicaciones trombóticas agudas. La mayoría de las trombosis de la arteria coronaria se activan con la ruptura de la placa aterosclerótica, que es controlada por el balance entre las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y los inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (TIMPs). La adiponectina aumenta selectivamente la expresión

de TIMP-1 en los macrófagos derivados de los monocitos a través de la inducción de IL-10 (Kumada *et al.*, 2004). En el presente estudio, en el grupo hipercolesterolémico, niveles elevados de IL-10 se asociaron con niveles elevados de TIMPs. Cabe destacar que en las ratas alimentadas con la dieta HCO se observó una disminución en la concentración de IL-10 y de TIMPs. Lin *et al.* (2014) mostraron que la quercetina causa una reducción de la expresión del mRNA de MMPs y TIMPs en ratas con lesión hepática colestásica. Así, de acuerdo con estos estudios, el aumento de los niveles de IL-10 en el presente estudio se asoció con un aumento de los niveles de TIMP-1 observados en el grupo HC, y de forma paralela se observó una disminución de los niveles de IL-10 y de TIMP-1 en las ratas del grupo HCO. Además, se observó que el grupo alimentado con la dieta HC mostraba un aumento en los niveles de PAI-1 y vWF. PAI-1 es una proteína protrombótica de fase aguda que suprime la fibrinólisis y contribuye en la aterogénesis al favorecer la formación de trombos (Lau *et al.*, 2005) y el vWF es reconocido como un indicador común de la inflamación y del daño endotelial (Horvath *et al.*, 2004). La disminución en la concentración del PAI-1 y del vWF en el grupo HCO comparado con el grupo HC podría apoyar el efecto positivo del enriquecimiento de la dieta con la cebolla mejorando el sistema de coagulación en las ratas alimentadas con la dieta HC. En este sentido, el consumo de cebolla o subproductos de cebolla ha sido previamente relacionado con propiedades antitrombóticas mediante la inhibición de la agregación plaquetaria (Ro *et al.*, 2015; Briggs *et al.*, 2001). Además, la suplementación dietética con *S*-allil cisteína y *S*-propil cisteína fueron capaces de disminuir la oxidación, la inflamación y la coagulación en ratones tratados con acetaminofeno (Hsu *et al.*, 2006).

El estudio de la actividad biológica del ingrediente de cebolla, se completó con la evaluación de los cambios en la microbiota presente en las heces de las ratas al principio y al final del periodo de alimentación con las diferentes dietas. Muchas son las investigaciones que demuestran que la ingesta de prebióticos produce una disminución en la población de bacterias clostridio-sulfito reductores mientras que aumentan las bacterias anaerobias a nivel intestinal (Santos *et al.*, 2006). Así mismo, los análisis de las heces evidenciaron que el recuento de las bacterias aerobias totales disminuyó significativamente en el grupo HCO en la semana 7. Anaerobios como *Enterobacter* spp o *E. coli* presentaron mayores recuentos en el grupo HCO que en el grupo HC en la semana 1. De igual modo, la presencia de clostridio-sulfito reductores fue 1,49 veces menor en el grupo HCO en comparación con el grupo HC después de 7 semanas. La cebolla es una fuente rica en

fructanos y fructooligosacáridos con propiedades inmunoestimulantes y prebióticas. Estudios previos han evidenciado que el consumo de cebolla puede disminuir el pH, aumentar la producción de butirato y de las actividades enzimáticas de la microbiota intestinal, modulando la funcionalidad de la microbiota intestinal en la rata. Por otra parte, se ha demostrado que diferentes fuentes de fructanos modifican las bacterias intestinales y consecuentemente dan lugar a posteriores cambios en los cultivos fecales (Pompei *et al.*, 2008; Rendón-Huerta *et al.*, 2012), afectando también al metabolismo del colesterol a través de la vía de absorción y de la vía biliar (Jones, 2008). De este modo, la acción prebiótica de los fructanos como la inulina, presente en la cebolla, estimula el crecimiento y la actividad de especies bacterianas probióticas, que podrían ayudar a la absorción intestinal de iones, a la modulación de los niveles de lípidos y del colesterol, y en el crecimiento de bífidobacterias en el colon (Roberfroid, 2007).

No obstante, la combinación de todos estos hallazgos junto con la información obtenida de los análisis de plasma, revirtió la hipótesis de atribuir la modulación positiva de los marcadores de inflamación a modificaciones en las poblaciones de bacterias, ya que gran parte de los cambios, incluyendo *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, fueron inducidos por igual en la microflora de los roedores del grupo HC y del grupo HCO. En este sentido, investigaciones recientes han demostrado la implicación de la microbiota intestinal en la hipercolesterolemia y en la inflamación de los tejidos (Neyrinck *et al.*, 2013). Así mismo, recientemente se ha establecido que los cambios de la microbiota intestinal pueden ayudar a modular el desarrollo de las enfermedades del hígado graso (Le Roy *et al.*, 2013). Mientras que el uso como probiótico de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* ha puesto de manifiesto un posible papel en la prevención de las enfermedades inflamatorias crónicas en estadios iniciales y en la disminución de las citoquinas inflamatorias. Por otra parte, la bioconversión de flavonoides podría estimular el crecimiento de especies de bacterias tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, estimulando el efecto prebiótico, en parte responsable de la inhibición de la agregación plaquetaria y la modulación del estímulo de las citoquinas (Cardona *et al.*, 2013; Tzounis *et al.*, 2008; Monagas *et al.*, 2010; Tzounis *et al.*, 2011; Molan *et al.*, 2011; Viveros *et al.*, 2011). Sin embargo, estas propiedades prebióticas asociadas a la salud, en relación con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, fueron únicamente observados en la primera semana de la alimentación experimental. Por lo tanto, estos datos sugieren que los metabolitos bioactivos de la cebolla podrían tener un efecto beneficioso prebiótico en las ratas alimentadas con la dieta HC, como se demostró mediante la mejora

de la inhibición gastrointestinal de la población microbiana patógena y la promoción del crecimiento de microorganismos beneficiosos en las fases iniciales del experimento. Sin embargo, fue escasa la contribución en el mantenimiento de la microflora intestinal con el tiempo, descartando este efecto como la causa principal de los efectos encontrados en las citoquinas y biomarcadores de riesgo cardiovascular.

Por otro lado, las dietas ricas en colesterol pueden modificar el metabolismo de los ácidos grasos, debido a que la esteroil-CoA desaturasa tiene un papel importante en el metabolismo de los lípidos, catalizando la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados a partir de los ácidos grasos saturados (Soliman *et al.*, 2002). El colesterol proveniente de la dieta intensifica la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), mientras que inhibe las vías de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Pita *et al.*, 2002). Debido a estos cambios, la composición lipídica de la membrana celular podría verse afectada modificándose la función normal de los receptores, transportadores y enzimas. Estudios científicos sugieren que la quercetina altera el metabolismo de los ácidos grasos influenciando la actividad de varias enzimas como la elongasa y la desaturasa (Regulski-Ilow e Ilow, 2008). Con el objetivo de investigar los efectos de la cebolla como ingrediente funcional en el perfil lipídico de las ratas hipercolesterolémicas, también se evaluó la composición de ácidos grasos del plasma, los eritrocitos, el hígado y el tejido adiposo.

El contenido de ácidos grasos saturados (SFA) en plasma e hígado disminuyó en los grupos a los que se les había suministrado una dieta rica en colesterol (HC y HCO), lo que se asoció al aumento del contenido de MUFA; de hecho otros autores presentaron resultados similares (Pita *et al.*, 2002). La disminución del contenido de SFA podría ser debida a la acción de la esteroil-CoA desaturasa, la cual puede convertir SFA en MUFA, el sustrato preferido para la acil-CoA-colesterol-aciltransferasa (ACAT), enzima que cataliza la esterificación de colesterol hepático libre en ésteres de colesterol inerte.

El ratio SFA:MUFA en plasma refleja la composición de la membrana fosfolipídica, y un incremento en dicho ratio está relacionado con enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Ntambi y Miyazaki, 2004). Sorprendentemente, en el presente estudio se observó que al comparar el ratio SFA:MUFA en las ratas del grupo HC y HCO con las del grupo C, el ratio era menor en los grupos hipercolesterolémicos, siendo más marcado en el grupo HCO. El ratio SFA:MUFA en los eritrocitos y en el hígado siguió un patrón similar al del plasma. La modificación lipídica en ratas hipercolesterolémicas puede estar asociada

con niveles altos de la actividad estearoil-CoA desaturasa estimulada por el colesterol y el ácido cólico de la dieta. De acuerdo con Afonso *et al.* (2013), el ratio C18:1 c9/C18 en hígado aparece significativamente elevado en todos los grupos que siguieron una dieta alta en colesterol (HC y HCO) en comparación con la dieta control. Este ratio se utiliza como índice de la actividad Δ -9 desaturasa, la que sugiere una mayor actividad estearoil-CoA desaturasa, como se corroboró en otras investigaciones con ratas Wistar hipercolesterolémicas (Viejo *et al.*, 2003). Otro hecho que influye en el aumento de C16:1 c9 y C18:1 c9 es la desaturación del C16 y del C18. En la presente Tesis Doctoral, en el hígado también se observó un incremento del C16:1 c9 en el grupo HC, siendo más marcado en el grupo HCO en comparación con el grupo C. El notable incremento en plasma e hígado en el grupo HCO en comparación con el grupo HC pudo ser debido a que el ingrediente de cebolla potenciara la actividad de las Δ -5- y Δ -6-desaturasas. La mayoría de cambios metabólicos tienen lugar en el hígado y tienen una relación directa con los cambios en el plasma; en este estudio los cambios fueron más marcados en el hígado que en el tejido adiposo. El fenómeno podría explicar el hecho que el C16:1 c9 se mantuviese estable en el tejido adiposo en comparación con el hígado y el plasma. Asimismo, se observó un notable incremento en la cantidad de C18:1 c9 en todos los tejidos, excepto en el tejido adiposo cuya cantidad disminuyó considerablemente en el grupo HC y de forma más marcada en el grupo HCO. La disminución de C18:1 c9 en el tejido adiposo de los roedores alimentados con la dieta rica en colesterol puede ser debida al hecho que las dietas hipercolesterolémicas aumentan la excreción fecal de esteroides (Madani *et al.*, 1998). En este sentido, la disminución fue mucho más pronunciada en animales a los que se les suministró la dieta hipercolesterolémica enriquecida con cebolla, probablemente debido al alto contenido en fibra insoluble de la cebolla. Los niveles de ácido esteárico (C18) disminuyeron considerablemente en todos los tejidos analizados a excepción del tejido adiposo, aparentemente debido a su alta tasa de conversión del ácido oleico (C18:1 c9) a ácido linoleico (C18:2 c9c12). Es bien conocido que algunas dietas afectan a la síntesis *de novo* de ácidos grasos y esto podría ser la razón por la que el ácido palmítico y el ácido esteárico disminuyeron en los grupos HC y HCO. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta son producidos por las bacterias intestinales (Arora *et al.*, 2011; Cowan *et al.*, 2014; Macfarlane y Macfarlane, 2003).

En el presente estudio, es razonable pensar que las dietas experimentales pueden estar afectando las vías metabólicas de estos microorganismos en el intestino de la rata. Los

ácidos como el araquidónico (C20:4n6, AA) y docosahexanoico (C22:6n3, DHA) son sintetizados en el tejido animal mediante la común desaturación Δ -6, a través de las llamadas enzimas Δ -6- y Δ -5-desaturasas y la enzima alternativa Δ -8-desaturasa (Cheul *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2004; Leonard *et al.*, 2004; Ntambi *et al.*, 1999). La vía común para la síntesis de C20:4n6 empieza con una desaturación del C18:2 c9c12 catalizada por la Δ -6-desaturasa, dando lugar al C18:3 c9c12c15, el cual por una elongación de 2 carbonos se transforma en C20:3n6. A continuación, por una Δ -5 desaturación se obtiene el C20:4n6. En el caso que la vía Δ -6-desaturasa esté ocupada, la vía alternativa es la Δ -8-desaturasa que empieza con la elongación del C18:2 c9c12, obteniendo así el C20:2. Posteriormente tiene lugar una desaturación catalizada por la Δ -8-desaturasa cuyo resultado es la formación de C20:3n6 para la síntesis de ácido araquidónico. De otra manera, si la síntesis de C20:4n6 fuese dependiente de la Δ -8-desaturasa, los intermediarios requeridos posteriormente serían C20:2n6 y C20:3n6. En el presente estudio, la ausencia de C18:3 c9c12c15 y la presencia de C20:2n6 y C20:3n6 en plasma, y la presencia de C20:3n6 en eritrocitos de ratas hipercolesterolémicas, con un incremento significativo de C18:1 c9 y C18:2 c9c12, puede sugerir una predominante utilización de la vía de la Δ -8 y ausencia de la Δ -6-desaturasa.

Sin embargo, en el hígado, el incremento de C18:1 c9 y C18:2 c9c12 y una concomitante disminución en los niveles de C20:4n6 y C22:6n3 en ratas hipercolesterolémicas en comparación con ratas normolipidémicas, sugirió una utilización de la vía Δ -6-desaturasa, y una disminución adicional de la Δ -6-desaturasa debido a la dieta rica en colesterol. Estos resultados están en concordancia con otros estudios (Madani *et al.*, 1998; Viejo *et al.*, 2003) que mostraron que en animales que recibieron una dieta rica en colesterol aumentaba el contenido de C18:2 c9c12 y disminuía el contenido C20:4n6 en hígado. Estos resultados sugieren que dietas ricas en colesterol inhiben la actividad de las desaturasas, viéndose mucho más afectada la Δ -5-desaturasa que la Δ -6-desaturasa.

Respecto al tejido adiposo, se produjo una disminución del C18:1 c9 en HC y en HCO (22,7 % y 44,2 %, respectivamente) en comparación con el grupo C, sugiriendo una relevante actividad Δ -5- y Δ -6-desaturasa en ratas, intensificada por el ingrediente cebolla. Como consecuencia, se observó un incremento notable en C20:4n6 (del 122,6 %) en el grupo HCO en comparación con el grupo C y el grupo HC.

En resumen, la realización de esta Tesis Doctoral permite disponer de una visión global sobre las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas de la cebolla

procesada con altas presiones y liofilizada como ingrediente funcional a través de estudios *in vitro* e *in vivo*:

Los resultados analizados en este trabajo indican que el tratamiento de alta presión hidrostática a 400 MPa/25 °C/5 min junto con un proceso de liofilización y pulverización (CPT2), fue el tratamiento que más favoreció la extracción de compuestos bioactivos de la cebolla, así como también dio lugar a una mayor actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Los compuestos volátiles de la cebolla, especialmente los sulfuros, son parte de los compuestos responsables de la actividad biológica de la cebolla. Así pues, en cuanto a compuestos sulfurados en las muestras CPT2 se observó un incremento del 2-metil-2-pentenal, dimetil trisulfuro y metil propil trisulfuro. Estos compuestos sulfurados poseen propiedades antitrombóticas al inhibir la agregación plaquetaria (Ro *et al.*, 2015; Briggs *et al.*, 2001) y son considerados compuestos capaces de reducir la oxidación, la inflamación y la coagulación (Hsu *et al.*, 2010).

Como ya indican otros estudios con flavonoides, dichos compuestos juegan un papel importante en la prevención de los procesos inflamatorios y en el estrés oxidativo, disminuyendo el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y patologías vinculadas al estrés oxidativo e inflamación, pudiendo dichos efectos ser potenciados cuando la matriz alimentaria es sometida a tratamientos con altas presiones al verse modificada la extractabilidad, bioaccesibilidad y funcionalidad de los flavonoides. En este sentido se observó un incremento del contenido fenólico en las muestras CP. Los resultados apuntan a un aumento de la extractabilidad de Q4G y Q3,4G sin afectar la concentración de quercetina. Cabe destacar que en las muestras CPT2 la concentración de isorhamnetina, I4G y de Q4G fue significativamente mayor que en las muestras del mismo grupo sometidas a diferentes presiones. Como se ha comentado previamente, dicho incremento puede ser debido a la disrupción de las vacuolas vegetativas donde están retenidos los compuestos fenólicos. No obstante, otro factor podría ser que las altas presiones facilitaran la extracción de fenoles unidos a la membrana celular.

Además, confirmando los datos de otros estudios, estos compuestos pueden desempeñar acciones antioxidantes, por ejemplo, aumentando la captación de radicales libres de NO^{*}, así como mejorando el secuestro del ABTS^{•+} y del DPPH^{*} y la capacidad de reducción férrica. En este sentido, los datos obtenidos indican un efecto positivo en la

actividad antioxidante en la combinación de altas presiones, liofilización y pulverización. Además, en el presente estudio se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre el contenido de Q4G con los valores de ABTS^{•+}, FRAP, PLC-ACL, los contenidos de Q3,4G e I4G con los valores del FRAP, y los contenidos de Q3G, Q3,4G, Q7,4G e I4G con valores de ABTS^{•+}. Las mejoras en la actividad antioxidante en las muestras CP apuntan a una modificación en la extractabilidad de los compuestos bioactivos como consecuencia de la combinación de los diferentes tratamientos.

En cuanto a la evaluación de los efectos de la cebolla procesada por alta presión hidrostática como ingrediente funcional en la actividad antiinflamatoria, antioxidante e hipocolesterolemica, los biomarcadores de riesgo cardiovascular y el perfil de ácidos grasos en ratas Wistar hipercolesterolémicas, al inducirse el estado de hipercolesterolemia en los roedores, se activa la producción de radicales libres dando lugar a un estado de estrés oxidativo. En el grupo de ratas hipercolesterolémicas al que se les suministró el ingrediente cebolla (HCO) se observó un efecto frente al estrés oxidativo potenciando la actividad de enzimas SOD, CAT y GPx en los eritrocitos y en el hígado, así como también se observó una disminución de las proteínas carboniladas.

Por otro lado, también se evaluó *in vivo* el efecto del ingrediente de cebolla en la actividad antiinflamatoria, obteniendo mejoras en el estado proinflamatorio y en el estado antiinflamatorio, al observarse una disminución de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en el grupo HCO, y de los biomarcadores de riesgo cardiovascular tales como MCP-1, VEGF, s-ICAM-1, sE-selectina, PAI-1, v-WF y TIMP-1.

En resumen, la mejora de la capacidad antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo* podría también justificarse por la modulación ejercida por los flavonoides y otros compuestos bioactivos del ingrediente de cebolla en varias vías de señalización inflamatorias inhibiendo la expresión de moléculas proinflamatorias, citoquinas, moléculas de adhesión y quimiotácticas, y como consecuencia inhibiendo la formación de la placa ateromatosa, retardando la aterosclerosis, mejorando el sistema de coagulación e inhibiendo la agregación plaquetaria.

A parte de los efectos de la dieta rica en colesterol citados anteriormente, también cabe destacar que puede verse modificado el metabolismo de los ácidos grasos y la composición lipídica de la membrana plasmática viéndose afectada y modificándose la función normal de las diferentes proteínas de membrana y su respectiva función. En este

sentido, podríamos decir que suministrar dietas ricas en colesterol a ratas modifica la composición de ácidos grasos individuales y en algunos casos dicha modificación puede verse potenciada por el ingrediente de cebolla, pudiendo ser debido al efecto potenciador de dicho ingrediente en la actividad de las enzimas Δ -5- y Δ -6-desaturasas. Aunque queda pendiente llevar a cabo estudios de intervención con humanos para corroborar los datos encontrados en el modelo animal utilizado en este estudio, la elaboración de esta Tesis ha permitido disponer de una evidencia científica para el desarrollo de ingredientes funcionales a partir de la combinación de los tratamientos con altas presiones, liofilización y pulverización.

En resumen, la caracterización cuali- y cuantitativa de los principales componentes bioactivos en términos de *S*-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos (ACSOs), polisulfuros y flavonoles de la cebolla procesada por diversos tratamientos de alta presión, nos ha permitido la selección del tratamiento de 400 MPa/25 °C/5 min como el tratamiento que más ha favorecido la extracción de compuestos bioactivos, así como el que ha dado lugar a mejores resultados en cuanto a actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* (**Artículo 1, Artículo 2 y Artículo 3**). A continuación, se llevó a cabo la preparación del ingrediente de cebolla tratado por alta presión hidrostática para realizar un estudio *in vivo* en un modelo de ratas Wistar con hipercolesterolemia inducida a través de la dieta (2 % colesterol) y evaluar sus potenciales propiedades beneficiosas para la salud. Entre ellas, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipolipidémicas, parámetros relacionados con la salud cardiovascular y efecto prebiótico. Los resultados indican que la incorporación en la dieta del ingrediente de cebolla ha contribuido a revertir el efecto negativo inducido por la dieta enriquecida en colesterol, como lo ponen de manifiesto la disminución de los biomarcadores de inflamación y de riesgo cardiovascular; así como el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes; en las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en un 2 % de colesterol y conteniendo un 10 % de cebolla (**Artículo 4 y Artículo 5**).

6.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA

La aplicación de las altas presiones y la liofilización de forma independiente en las muestras de cebolla no afectó a la concentración de ACSOs y azúcares totales. No obstante, al combinar los tratamientos (APH y liofilización-pulverización), la concentración de ACSOs disminuyó a presiones de 400 y 600 MPa (CPT2 y CPT3, respectivamente), mantuvo las concentraciones de la mayoría de ácidos orgánicos, azúcares totales, proteína total y minerales, e incrementó el contenido de ácido ascórbico y vitamina C.

SEGUNDA

La cebolla tratada con altas presiones a 200 y 400 MPa presentó una mayor concentración total de compuestos volátiles en comparación con la cebolla no tratada (CTT0), debido a un aumento en la concentración de dipropil disulfuro, metil propil trisulfuro y dipropil trisulfuro. En cambio, la concentración total de compuestos volátiles se vio disminuida en las muestras presurizadas y liofilizadas-pulverizadas (CPT1, CPT2, CPT3) en comparación con las muestras CPT0. De forma individual, la extractabilidad del dipropil disulfuro, propionaldehído y del dimetil trisulfuro se vio favorecida al combinar los diferentes tratamientos (APH y liofilización-pulverización).

TERCERA

El tratamiento de altas presiones junto con un proceso de liofilización y pulverización en la cebolla (CPT1, CPT2 y CPT3) favoreció la extractabilidad de quercetina 3,4'-diglucósido, quercetina 4'-glucósido, quercetina 3'-glucósido e isorhamnetina 3,4'-diglucósido, presentando una mayor concentración de los mismos que en las muestras no presurizadas (CPT0).

CUARTA

Las actividades antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de la cebolla sometida a un tratamiento combinado de altas presiones, liofilización y pulverización, presentaron incrementos significativos en comparación con las muestras CTT0 y con las CT

presurizadas (CTT1, CTT2, CTT3), al verse modificada la extractabilidad de los flavonoides y los compuestos organosulfurados como consecuencia de la combinación de los diferentes tratamientos. El tratamiento a 400 MPa/25 °C/5 min junto con un proceso de liofilización y pulverización, fue el tratamiento que más favoreció la extracción de compuestos bioactivos de la cebolla, así como el que presentó una mayor actividad antiinflamatoria, destacando la captación de radicales libres NO[•], y una remarcable actividad antioxidante.

QUINTA

Las ratas Wistar alimentadas durante 7 semanas con una dieta hipercolesterolémica enriquecida al 10 % con cebolla como ingrediente funcional presentaron una disminución de los valores de las enzimas hepáticas ALT/GPT y AST/GOT que se encontraron más elevados en las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica. Además, las ratas Wistar alimentadas durante 7 semanas con una dieta hipercolesterolémica enriquecida al 10 % con cebolla como ingrediente funcional presentaron un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en los eritrocitos y en hígado, y una disminución de los biomarcadores de inflamación y de riesgo cardiovascular, tales como IL-10, MCP-1, VEGF, s-ICAM-1, sE-selectina, PAI-1, v-WF y TIMP-1.

Además, el enriquecimiento de la dieta con el ingrediente de cebolla, produjo ciertas modificaciones beneficiosas en la microbiota de las ratas, como lo demuestra el incremento que se produjo en *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. durante la primera semana y la disminución de *Clostridium* spp. después de siete semanas de alimentación con las diferentes dietas.

SEXTA

La incorporación de la cebolla como ingrediente funcional en la dieta hipercolesterolémica de las ratas Wistar, contribuyó a revertir los efectos negativos inducidos por la presencia de colesterol, potenciando la actividad antioxidante, mejorando el estado proinflamatorio y antiinflamatorio, y ejerciendo un efecto hepatoprotector y antitrombótico.

SÉPTIMA

La inclusión del ingrediente de cebolla en la dieta rica en colesterol de las ratas Wistar potenció la modificación de la composición de ácidos grasos individuales, inducida por el colesterol. En el tejido adiposo de ratas hipercolesterolémicas disminuyó la concentración de C18:1 n-7 (ácido oleico), sugiriendo una importante actividad de las Δ -5 y Δ -6 desaturasas, actividad que se vio incrementada por el ingrediente cebolla, aumentando como consecuencia la concentración de C20:4n-6 (ácido araquidónico).

7.BIBLIOGRAFÍA

A

- Abe R, Beckett J, Abe R, Nixon A, Rochier A, *et al.* Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2011; 41:814-820.
- Abonyi BI, Feng H, Tang J, Edwards CG, Chew BP, *et al.* Quality retention in strawberry and carrot purees dried with Refractance Window TM system. *Journal of Food Science*. 2002; 67:1051-1056.
- Afonso MS, de Silva AMO, de Carvalho EBT, Rivelli DP, Barros SBM, *et al.* Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutrition and Metabolism*. 2013; 10:19.
- Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, *et al.* PASSCLAIM: consensus on criteria. *Europe Journal of Nutrition*. 2005; 44 :5-30.
- Alkhamees OA. Protective effects of vitamin-P and vitamin-C on hypercholesterolemia-induced oxidative hepatic damage and lipid profile changes in female rats: A comparative study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013; 3:99-105.
- Anderson OMJ. The anthocyanins. In: Anderson OMM, K. R., editor. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*: CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA; 2006. P. 472-551.
- Andujar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, *et al.* Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59:6474-83.
- Angeli V, LLodra J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, *et al.* Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2004; 21:561-574.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002; 127:183-198.
- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1995.
- Argyropoulos D, Heindl A, Muller J. Assessment of convection, hot-air combined with microwave-vacuum and freeze-drying methods for mushrooms with regard to product quality. *International Journal of Food Science and Technology*. 2011; 46:333-342.
- Arora T, Sharma R, Frost, G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*. 2011; 56:511-515.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy - Review of a new approach. *Pharmacological Reviews*. 2003; 55:241-269.
- Asami DK, Hong YJ, Barrett DM, Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51:1237-1241.
- Asaq SM, Inamdar MN. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Interactions of Propranolol with Garlic (*Allium sativum*) in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;

2011;824042.

Askari GR, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM. An Investigation of the Effects of Drying Methods and Conditions on Drying Characteristics and Quality Attributes of Agricultural Products during Hot Air and Hot Air/Microwave-Assisted Dehydration. *Drying Technology*. 2009; 27:831-841.

B

Bacon JR, Moates GK, Ng A, Rhodes MJC, Smith AC *et al.* Quantitative analysis of flavour precursors and pyruvate levels in different tissues and cultivars of onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*. 1999; 64:257–261.

Bakker GC, Van Erk MJ, Pellis L, Wopereis S, Rubingh CM, *et al.* An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010; 91:1044-1059.

Bakr AA, Gawish RA. Current studies on onion and its pungency Part. 2. Interactive effects of sulfur fertilization and drying under the aspect of solar energy utilization. *Molecular Nutrition and Food Research*. 1998; 42:94-101.

Bang M – A, Kim H-A. Dietary supplementation of onion inhibits diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinogenesis. *Food Science of Biotechnology*. 2010; 19:77-82.

Bang M-A, Kim H-A, Cho Y-J. Alterations in the blood glucose, serum lipids and renal oxidative stress in diabetic rats by supplementation of onion (*Allium cepa* Linn). *Nutrition Research and Practice*. 2009; 3:242-246.

Barba FJ, Cortés C, Esteve MJ, Frígola A. Study of antioxidant capacity and quality parameters in

an orange juicemilk beverage after high-pressure processing treatment. *Food Bioprocess Technology*. 2012; 5:2222-2232.

Barret DM, Lloyd B. Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92:7-22.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, *et al.* Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research*. 2004; 95:764-772.

Benedetti F, Davinelli S, Krishnan S, Gallo RC, Scapagnini G, *et al.* Sulfur compounds block MCP-1 production by Mycoplasma fermentans-infected macrophages through NF-κB inhibition. *Journal of Translational Medicine*. 2014; 12, Article number 145.

Benítez V, Mollá E, Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, López-Andréu FJ, *et al.* Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2011; 66:48-57.

Benkeblia N, Varoquaux P. Effect of nitrous oxide (N₂O) on respiration rate, soluble sugars and quality attributes of onion bulbs *Allium cepa* cv. Rouge Amposta during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 2003; 30:161–168.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239:70–76.

Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, *et al.* Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition*. 2009; 25:1202-1205.

Bigliardi B, Galati F. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*. 2013; 31:118–

- 129.
- Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, *et al.* Response of Spores to High-Pressure Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2007; 6:103-119.
- Blasi C. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2008; 201:17-32.
- Bodo R, Azzouz A, Hausler R. Antioxidative activity of water hyacinth components. *Plant Science*. 2004; 166:893-899.
- Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, *et al.* Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition*. 1999; 129:1182-1185.
- Bora KS, Sharma A. Phytoconstituents and therapeutic potential of *Allium cepa* Linn. - A Review. *Pharmacognosy Review*. 2009; 3:170-180.
- Bosetti C, Filomeno M, Riso P, Polesel J, Levi F, *et al.* Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Annals of Oncology*. 2012; 23:2198-203.
- Bralley E, Greenspan P, Hargrove JL, Hartle DK. Inhibition of hyaluronidase activity by *Vitis rotundifolia* (Muscadine) berry seeds and skins. *Pharmaceutical Biology*. 2007; 45:667-673.
- Brennan P, Hsu CC, Moullan N, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, *et al.* Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet*. 2005; 366:1558-60.
- Briggs WH, Folts JD, Osman HE, Goldman IL. Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *Journal of Nutrition*. 2001; 131:2619-2622.
- Briones-Labarca V, Muñoz C, Maureira H. Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Research International*. 2011b; 44:875-883.
- Briones-Labarca V, Venegas-Cubillos G, Ortiz-Portilla S, Chacana-Ojeda M, Maureira H. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*. 2011a; 128:520-529.
- Bull MK, Zerdin K, Howe E, Goicoechea D, Paramanandhan P, *et al.* The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2004; 5:135-149.
- Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, Drake J, Scapagnini G, *et al.* Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13:444-461.
- Butz P, Bogner A, Dieterich S, Tauscher B. Effect of High-Pressure Processing at Elevated Temperatures on Thiamin and Riboflavin in Pork and Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55:1289-1294.
- Butz P, Edenharder R, Fernández García A, Fister H, Merkel C, *et al.* Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*. 2002; 35:295-300.
- Butz P, Koller WD, Tauscher B, Wolf S. Ultra-high pressure processing of onions: chemical and sensory changes. *LWT- Food Science and Technology*. 1994; 27:463-467.

Butz P, Tauscher B. Recent studies on pressure-induced chemical changes in food constituents. *High Pressure Research*. 2000; 19:11–18.

C

Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Gorssi G, *et al.* Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49:6026-6032.

Calvo DR, Martorell P, Genovés S, Gosálbez L. Development of novel functional ingredients: need for testing systems and solutions with *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Food Science and Technology*. 2016; 54:197-203.

Cardelle-Cobas A, Costo R, Corzo N, Villamiel M. Fructo-oligosaccharide changes during the storage of dehydrated commercial garlic and onion samples. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009; 44:947–952.

Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Review: Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24:1415-1422.

Castro-Gómez P, Fontecha J, Rodríguez-Alcalá L. M. A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*. 2014; 128:518–523.

Chan EWC, Lim YY, Wong SK, Lim KK, Tan SP, Lianto FS and Yong MY. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*. 2009; 113:166-172.

Chan JCC, Cheung PCK, Ang PO. Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed

Sargassum hemiphyllum (Turn) C Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45:3056-3059.

Chang C-H, Lin H-Y, Chang C-Y, Liu Y-C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*. 2006; 77: 478-485.

Chang C-I, Hsu C-M, Li T-S, Huang S-D, Lin C-C, *et al.* Constituents of the stem of *Cucurbita moschata* exhibit antidiabetic activities through multiple mechanisms. *Journal of Functional Foods*. 2014; 10:260-273.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*. 1993; 13:2165-2170.

Chêftel JC. Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualités des Industries Alimentaires et Agro-Alimentaire*. 1991; 108:141-153.

Chen S, Zhou N, Zhang Z, Li W. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 457:608–613.

Chen YK, Lee CH, Wu IC, Liu JS, Wu DC, *et al.* Food intake and the occurrence of squamous cell carcinoma in different sections of the esophagus in Taiwanese men. *Nutrition*. 2009; 25:753-61.

Chen Y-Y, Lai M-H, Hung H-Y, Liu J-F. Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. “Tainong 57”] starch improves insulin sensitivity in high-fructose diet-fed rats by ameliorating adipocytokine levels, pro-inflammatory status, and insulin signaling. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2013; 59: 272–280.

Cheul Kim Y, Nitambi M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes; role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

- 1999; 266:1–4.
- Chin ST, Nazimah SAH, Quek SY, Man YBC, Rahman RA, *et al.* Changes of volatiles' attribute in durian pulp during freeze- and spray-drying process. *LWT- Food Science and Technology*. 2008; 41:1899-1905.
- Choi K – M, Lee Y – S, Shin D – M, Lee S, Yoo K – S, *et al.* Green tomato extract attenuates high-fat-diet-induced obesity through activation of the AMPK pathway in C57BL/6 mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24: 335-342.
- Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, Ben Slima A, Makni M, *et al.* Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2,9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 746:96-105.
- Chu F-LE, Lund ED, Harvey E, Adlof R. Arachidonic acid synthetic pathways of the oyster protozoan parasite, *Perkinsus marinus*: Evidence for usage of a delta-8 pathway. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2004; 133:45–51.
- Cilla A, Alegría A, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Cano MP, Plaza L, Clemente G, Lagarda MJ, Barberá R. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids and ascorbic acid from milk and soya-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60: 7282-7290.
- Clementz A, Delmoro J. Snacks frutales. *Invenio*. 2011; 14:153-163.
- Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*. 2007; 18:609-625.
- Corzo-Martínez M, Villamiel M. In: Onion Consumption and Health. An overview on Bioactivity of onion. *Nova Science Publishers, Inc.* 2012.
- Cowan TE, Palmnäs MSA, Yang J, Bomhof MR, Ardell KL, *et al.* Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014; 25:489–495.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, *et al.* Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2002; 50:618-621.
- Crosby GA. Lignans in food and nutrition. *Food Technology*. 2005; 59: 32-35.
- Crozier A, Ashihara H, Clifford M. Plant secondary metabolites and the human diet. Edn, 2006. Blackwell Publishing: Oxford.
- Crozier A, Yokota T, Jaganath I, Marks S, Saltmarsh M, *et al.* Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. In: Crozier A AH, Clifford MN, ed[^](eds). Plant secondary Metabolites and the human diet, edn, 2006b. Oxford: Blackwell Publishing. p. 208-302.
- Crozier TW, Stalmach A, Lean ME, Crozier A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food Function*. 2012; 3:30-33.
- Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*. 2005; 85:9-23.

D

- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovanni C, *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanita*. 2007; 43: 348-461.

- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversias. *International Journal of Molecular Science*. 2010; 11:1321-1342.
 - Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15:7313-52.
 - Daoudi L, Quevedo JM, Trujillo AJ, Capdevila F, Bartra E, *et al.* Effects of High-Pressure Treatment on the sensory Quality of White Grape Juice. *High Pressure Research*. 2002; 22:705-709.
 - Davis F, Terry LA, Chope GA, Faul CFJ. Effect of extraction procedure on measured sugar concentrations in onion (*Allium cepa* L.) bulbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55:4299-4306.
 - Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *British Journal of Nutrition*. 2001; 1:105-110.
 - De Ancos B, González E, Cano MP. Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2000; 48:3542-3548.
 - De Ancos B, Sgroppo S, Plaza L, Cano MP. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002; 82:790-796.
 - De Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira RdeP, Pedrosa ML. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile rats. *Nutrition*. 2010; 26:804-810.
 - Delgado L, Martínez G. Oxidative stress in cardiovascular disease: Evidences for a more integral treatment. *Revista Cubana de Farmacia*. 2009; 43.
 - Dincer I. Refrigeration Systems and Applications. 2003. *John Wiley & Sons*, England, pp. 534-536.
 - Dorsch W, Schneider E, Bayer T, Breu W, Wagner H. Anti-inflammatory effects of onions: Inhibition of chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes by thiosulfates and cepaenes. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 1990; 92:39-42.
- E**
- Ebeid HM, Gibriel AA, Al-Sayed HM, Elbehairy SA, Motawe EH. Hepatoprotective and antioxidante effects of wheat, carrot, and mango as nutraceutical agents against CCl₄-induced hepatocellular toxicity. *The Journal of the American College of Nutrition*. 2015; 34:228-31.
 - El-Demerdash FM, Yousef MI, Abou El-Naga NI. Biochemical study on the hypocychemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43:57-63.
- F**
- FAO 2014. FAOSTAT crop production database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>
 - Fernández García A, Butz P, Bognàr A, Tauscher B. Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*. 2001; 213:290-296.
 - Ferrari G, Maresca P, Ciccarone R. The application of high hydrostatic pressure for the stabilization

- of functional foods: pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*. 2010; 100:245-253.
- Ford MA, Allison TG, Lerman A. New approaches to the concept of primary prevention of atherosclerosis. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 2008; 10:73-82.
- Fotis L, Agrogiannis G, Vlachos IS, Pantopoulou A, Margoni A, *et al.* Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In vivo*. 2012; 26:243-250.
- Fukushima S, Takada N, Wanibuchi H, Hori T, Min W, *et al.* Suppression of chemical carcinogenesis by water-soluble organo-sulphur compounds. *Journal of Nutrition*. 2001; 131:1049s-1053s.
- ## G
- Gabler N, Osrowska E, Imsic M, Eagling D, JOis M, *et al.* Dietary onion intake as part of a typical high fat diet improves indices of cardiovascular health using the mixed sex pig model. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006; 61:179-85.
- Gabrovska D, Paulickova I, Moskova E, Fiedlerova V, Kocurova K, *et al.* Changes in selected vitamins, microorganism counts and sensory quality during storage of pressurized sprouted seed of alfalfa (*Medicago sativa*, L.). *Czech Journal of Food Science*. 2005; 23:246-250.
- Galeone C, Pelucchi C, Dal Maso L, Negri E, Montella M, *et al.* *Allium* vegetables intake and endometrial cancer risk. *Public Health Nutrition*. 2009; 12:1576-9.
- Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, *et al.* Onion and garlic use and human cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 84:1027-32.
- Gao QH, Wu CS, Wang M, Xu BN, Du LJ. Effect of drying of jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.) on the contents of sugar, organic acids, α -tocopherol, β -carotene, and phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60:9642–9648.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Wittemand JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002; 75:880-86.
- George JP, Datta AK. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetables slices. *Journal of Food Engineering*. 2002; 52:89–93.
- Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 2001; 104:503-16.
- González ME, Jernstedt JA, Slaughter DC, Barrett DM. Influence of cell integrity on textural properties of raw, high pressure, and thermally processed onions. *Journal of Food Science*. 2010b; 75:E409–E416.
- González ME, Jernstedt JA, Slaughter DC, Barrett DM. Microscopic quantification of cell integrity in raw and processed onion parenchyma cells. *Journal of Food Science*. 2010a; 75:E402–E408.
- González-Peña D, Angulo J, Vallejo S, Colina-Coca C, De Ancos B, *et al.* High-cholesterol diet enriched with onion affects endothelium-dependent relaxation and NADPH oxidase activity in mesenteric microvessels from Wistar rats. *Nutrition and Metabolism*. 2014; 11:57.
- González-Peña D, Dudzik D, Colina-Coca C, De Ancos B, García A, *et al.* Evaluation of onion as a functional ingredient in the prevention of metabolic impairments associated to diet-induced hypercholesterolaemia using a multiplatform

- approach based on LC-MS, CE-MS and GC-MS. *Journal of Functional Foods*. 2015; 19:363-375.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C. Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: The preferential route for atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12:1343-53.
- Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B. Onions-a global benefit to health. *Phytotherapy Research*. 2002; 16:603-615.
- Gross M, Jaenicke R. Proteins under high pressure: the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*. 1994; 221:617-630.
- Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators of Inflammation*. 2012; 693083.
- Gülçin I, Huyut Z, ELMastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 2010; 3:43-53.
- Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*. 2012; 86:345-91.
- Gupta N, Porter TD. Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131:1662-1667.
- Gutteridge JMC. Biological origin of free-radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. 1994; 91:133-140.
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess M-H, Le Bon A-M. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutation Research*. 2001; 495:135-145.
- ## H
- Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 476:107-12.
- Han X, Boisvert WA. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thrombosis Haemostasis*. 2015; 113:505-12.
- Han X, Kitamoto S, Wang, Boisvert WA. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *The FASEB Journal*. 2010; 24:2869-2880.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6:508-519.
- Hansson, GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 7:328-331.
- Hardborne JB. The anthocyanins. In: Harborne JB (ed.). *The flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall. 1993; p.1-20.
- Hassan W, Ding L, Gao R, Liu J, Shang J. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders. *Cytokine*. 2014; 66:133-142.
- Hazra B, Biswas S, Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2008; 8:63.
- He B, Hao J, Sheng W, Xiang Y, Zhu H, et al. Fistular onion stalk extract exhibits anti-

- atherosclerotic effects in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014; 8:785-792.
- Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Seidkhani-Nahal. Lipid-lowering effect of artichoke on liver phosphatidate phosphydrolase and plasma lipids in hyperlipidemic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5: 4918-1924.
- Heinonen SE, Kivela AM, Huusko J, Dijkstra Mh, Gurzeler E, *et al*. The effects of VEGF-A on atherosclerosis, lipoprotein profile, and lipoprotein lipase in hyperlipidaemic mouse models. *Cardiovascular Research*. 2013; 99:716-723.
- Heinz V, Buckow R. Food preservation by high pressure. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2010; 5:73-81.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104:2673-2678.
- Hertog MG, Bueno-de-mesquita HB, Fehily Am, Sweetnam PM, Elwood PC, *et al*. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1996; 5:673-677.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. 1993; 342:1007-1011.
- Hite BH. The effects of pressure in the preservation of milk. Bull. West Virginia University of Agric Expert Sta., Morgan Town. 1899; 58:15-35.
- Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Food Science and Agriculture*. 2000; 80:1081-1093.
- Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1 induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*. 2005; 105:1405-1407.
- Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. Biological effects of high hydrostatic pressuer on food microorganisms. *Food Technology*. 1989; 43:99-107.
- Horvath B, Hegedus D, Szapary L, Marton Z, Alexy T, *et al*. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Experimental and Clinical Cardiology*. 2004; 9:31-34.
- Houska M, Strohalm J, Kocurova K, Totusek J, Lefnerova D, *et al*. High pressure and foods fruit/vegetable juices. *Journal of Food Engineering*. 2006; 77:386-398.
- Hsieh Y-L, Yeh Y-H, Lee Y-T, Huang C-Y. Dietary potato peel extract reduces the toxicit of cholesterol oxidation products in rats. *Journal of Functional Foods*. 2016; 27:461-471.
- Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, *et al*. *Allium* vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94:1648-51.
- Hsu C, Lin CC, Liao TS, Yin MC. Protective effect of S-allyl cysteine and S-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 44:393-397.
- Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry*. 2003; 83:85-92.
- Hsu KC, Tan FJ, Chi HY. Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of

pressurized tomato juice during refrigerated storage. *LWT – Food Science and Technology*. 2008; 41:367- 375.

Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:1841-1856.

Hyun SW, Jang M, Park SW, Kim EJ, Jung YS. Onion (*Allium cepa*) extract attenuates brain edema. *Nutrition*. 2013; 29:244-249.

I

Indrawati, Arroqui C, Messagie I, Messagie MT, Van Loey A, Hendrickx M. Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2004; 52:485–492.

Institute of Food Technologists. Functional foods: Opportunities and challenges. March 2005. http://www.ift.org/~media/Knowledge%20Center/Science%20Reports/Expert%20Reports/Functional%20Foods/Functionalfoods_expertreport_full.pdf

International Life Sciences Institute. Perspectives on ILSI' international activities on functional foods. <http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/O2009Perspectives.pdf>

Ioannidis O, Varnalidis I, Paraskevas G, Botsios D. Nutritional modulation of the inflammatory bowel response. *Digestion*. 2011; 84:89-101.

Islam MS, Loots DT, Choi H. Effects of dietary onion (*Allium cepa* L.) in high-fat diet streptozotocin induced diabetes rodent model. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2008; 53:6-12.

Iwashina T. The structure and distribution of the

flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. 2000; 113:287-299.

J

Jacob K, Periago MJ, Böhm. Ros Berruezo G. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *British Journal of Nutrition*. 2008; 99:137-146.

Jaganath IB, Crozier A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: John Willey & Sons I (ed). Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology. Hoboken, New Jersey. 2010.

Jaime L, Martínez F, Martín-Cabrejas MA, Mollá E, López-Andréu FJ *et al.* Effect of storage on fructan and fructooligosaccharides of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49:982–988.

Jaime L, Mollá E, Fernández A, Martín-Cabrejas MA, López-Andréu FJ, *et al.* Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:122-128.

Jain NK, Singhai AK. Ameliorative effects of *Spinacia oleracea* L. seeds on carbon tetrachloride (CCl₄) – induced hepatotoxicity: *In vitro* and *in vivo* studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;S232-S237.

Japan Ministry of Health, Labour, and Welfare. Food for specialized health uses. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>

Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-*

- Biological Interactions*. 2008; 176:88-98.
- Jiménez-Escrig A, Dragsted LO, Daneshvar B, Pulido R, Saura-Calixto F. In vitro antioxidant activities of edible arichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 5540-5545.
- Jones PJH. Dietary agents that target gastrointestinal and hepatic handling of bile acids and cholesterol. *Journal of Clinical Lipidology*. 2008; 2:S4-S10.
- Joseph MA, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Bowman ED, *et al.* Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutrition and Cancer*. 2004; 50:206-213.
- Jun X. Application of high high hydrostatic pressure processing of food to extracting lycopene from tomato paste waste. *High Pressure Research*. 2006; 26:33-41.
- Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O. Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition and Metabolism*. 2011; 8:18.
- ## K
- Kallio H, Salorinne L. Comparison of onion varieties by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990; 38:1560-1564.
- Karam MC, Petit J, Zimmer D, Djantou EB, Scher J. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013; 188:32-49.
- Kato R, Mori C, Kitazato K, Arata S, Obama T, *et al.* Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2009; 29:33-39.
- Keenan DF, Rößle C, Gormley R, Butler F, Brunton NP. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*. 2012; 45:50-57.
- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of Internal Medicine*. 1996; 156:637-642.
- Khaled HB, Ghilissi Z, Chtourou Y, Hakim A, Ktari N, *et al.* Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinelle aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International*. 2012; 45:60-68.
- Kim J, Kim J-S, Park E. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 62:199-204.
- Kim J-M, Park E. Effect of onion consumption on cardiovascular disease in human intervention studies: A literature review. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2010; 39,1565-1572.
- Kim Y-S, Seoa H-Y, No K-M, Shim S-L, Yang S-H, *et al.* Comparison of Volatile Organic Components in Fresh and Freeze Dried Garlic. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2005; 34:885-891.
- Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, *et al.* Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. *Atherosclerosis*. 2011; 218:44-52.

- Ko S-H, Park J-H, Kim S-Y, Lee SW, Chun S-S, *et al.* Antioxidant effect of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2014; 19:19-26.
- Köhnke R, Lindqvist A, Goransson N, Emek SC, Albertsson P-Å, *et al.* Thylakoids suppress appetite by increasing cholecystokinin resulting in lower food intake and body weight in high-fat fed mice. *Phytotherapy Research*. 2009; 23:1778-1783.
- Krokida MK, Philippopoulos C. Volatility of apples during air and freeze drying. *Journal of Food Engineering*. 2006; 73:135-141.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, *et al.* How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80:15-21.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, *et al.* How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80:15-21.
- Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, *et al.* Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 2004; 109:2046-2049.
- Kumar SA, Sudhakar V, Varalakshmi, P. Attenuation of serum lipid abnormalities and cardiac oxidative stress by eicosapentaenoate-lipoate (EPA-ALA) derivative in experimental hypercholesterolemia. *Clinica Chimica Acta*. 2005; 335:197-204.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Patología humana. *Elsevier*. 2005
- Kumari K, Augusti KT. Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109:367-371.
- Kuppusamy UR, Khoo HE, Das NP. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochemical Pharmacology*. 1990; 40:397-401.
- Kwak NS, Jukes DJ. Functional foods, Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. 2001; 12:99-107.
- Kwok BHL, Hu C, Durance T, Kitts DD. Dehydration techniques affect phytochemical contents and free radical scavenging activities of saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt). *Journal of Food Science*. 2004; 69:122-116.
- Kwon SH, Ahn IS, Kim SO, Kong CS, Chung HY, *et al.* Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10:552-556.
- Kyung KH. Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current opinion in Biotechnology*. 2012; 23:142-147.

L

- Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 2000; 48:2848-2852.
- Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier J-M. Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*. 1999; 67:7-16.
- Landl A, Abadias M, Sarraga C, Vinas I, Picouet PA. Effect of high pressure processing on quality of acidified Granny Smith apple puree product. *Innovative Food Science and Emerging*

- Technologies*. 2010; 11:557–564
- Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography. A*. 2006;112:3-22.
- Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 288:H2031-H2041.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hunkin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92:154-60.
- Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013; 62:1787-1794.
- Leatherhead Food Research. Future Directions for the Global Functional Foods Market. *Leatherhead Food Research*. Leatherhead, UK. 2014.
- Lee B, Jung J-H, Kim H-S. Assessment of red onion on antioxidant activity in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50:3912–3919.
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004; 3:21-33.
- Lee JH, Felipe P, Yang YH, Kim MY, Kwon OY, *et al.* Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*. 2009; 101:1246-1254.
- Lee K – H, Park E, Lee H – J, Kim M – O, Cha Y – J, *et al.* Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutrition Research and Practice*. 2011; 5:28-33.
- Lee MK, Bok SH, Jeong TS, Moon SS, Lee SE, *et al.* Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2002; 10:2239-2244.
- Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 2004; 43:36–54.
- Leong SY, Oey I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2012; 133:1577–1587.
- Li W, Tang C, Jin H, Du J. Effects of onion extract on endogenous vascular H₂S and adrenomedulin in rat atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12:1427–1439.
- Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57:11463-11468.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *Journal of American College of Cardiology*. 2009; 54:2129-2138.
- Libby, P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *American Journal of Medicine*. 2008; 121:S21-S31.
- Lin C-C, Yin M-C. Antiglycative and anti-VEGF effects of *s*-ethyl cysteine and *s*-propyl cysteine in kidney of diabetic mice. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2008; 52:1358-1364.
- Lin HJ, Probst-Hensch NM, Louie AD, Kau IH, Witte JS, *et al.* Glutathione transferase null

- genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 1998b; 7:647-52.
- Lin SY, Wang YY, Chen WY, Chuang YH, Pan PH, *et al.* Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014; 25:1183-1195.
- Lin TM, Durance TD, Scaman CH. Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. *Food Research International*. 1998; 31:111-117.
- Liu Y, Zhao Y, Feng X. Exergy analysis for a freeze-drying process. *Applied Thermal Engineering*. 2008; 28:675–690.
- Lu X, Wang J, Al-Qadiri HM, Ross CF, Powers JR, Tang J, Rasco BA. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa* L.) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 2011; 129:637-644.
- Ludvik B, Waldhäusl W, Prager R, Kautzky-Willer A, Pacini G. Mode of action of *Ipomoea batatas* (Caiapo) in type 2 diabetic patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2003; 52: 875–880.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407:233-241.
- ## M
- Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003; 62:67–72.
- Madani S, Lopez S, Blond JP, Prost J, Belleville J. Highly purified soybean protein is not hypercholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*. 1998; 128:1084–1091.
- Maeda N, Kokai Y, Hada T, Yoshida H, Mizushima Y. Oral administration of monogalactosyl diacylglycerol from spinach inhibits colon tumor growth in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013; 5:17-22.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011; 35:676-692.
- Mahmoudabady M, Kazemi N, Niazmand S, Rezaee SA, Soukhtanloo M, *et al.* The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on inflammatory and angiogenic factors in hypercholesterolaemia. *Pharmacological Reports*. 2015; 67:837-841.
- Maksoud HA, EL-Senosi Y, Desouky A, Sorour R, Elgerwi A, *et al.* Antihyperlipidemic effect of iced black tea (*Camellia sinensis*) extract. *Molecular and Clinical Pharmacology*. 2012; 3:8-20.
- Mallor C, Thomas B. Resource allocation and the origin of flavour precursors in onion bulbs. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2008; 83:191–198.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79:727-747.
- Mao LC, Pan X, Que F, Fang XH. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*. 2006; 222:236–241.
- Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in

- atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Current Opinion in Lipidology*. 2001; 12:535-541.
- Martínez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results in Cancer Research*. 2005; 166:177-211.
- Martínez S, López M, González-Raurich M, Bernardo Alvarez A. The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005; 56:45-51.
- Marzocchella L, Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Tresoldi I, *et al.* Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*. 2011; 5:200-220.
- Mazza G, Cacace JE, Kay CD. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC International*. 2004; 87:129-145.
- McInerney JK, Seccafien CA, Stewart CM, Bird AR. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability in vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007; 8:543-548.
- Mehmetçik G, Özdemirler G, Koçak-Toker N, Çevikbaş, Uysal M. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2008; 60:475-480.
- Melse-Boonstra A, Verhoef P, Konings EJM, Van Dusseldorp M, Matser A, *et al.* Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower and green beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:3473-3478.
- Miglio C, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56:139-147.
- Millen AE, Subar AF, Graubard BI, Peters U, Hayes RB, *et al.* Fruit and vegetable intake and prevalence of colorectal adenoma in cancer screening trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 86:1754-64.
- Mocelin R, Marcon M, Santo GD, Zanatta L, Sachett A, Schönell AP, *et al.* Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cyanara scolymus* in cholesterol-fed rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; 26:233-239.
- Mohammadi-Motlagh H-R, Mostafaie A, Mansouri K. Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonium*) extract. *Archives of Medical Science*. 2011; 7:38-44.
- Molan AL, Liu Z, Kruger M. The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 26:1735-1743.
- Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva C, Urpi-Sardá M, Vázquez-Agell M, *et al.* Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition*. 2009; 102:201-206.
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patan F, Llorach R, Garrido I, *et al.* Insights into the metabolism and microbial biotransformation of

- dietary flavan3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*. 2010; 1:233-253.
- Mondy N, Duplat D, Christidès JP, Auger J. Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002; 963:89-93.
- Montelius C, Szwiec K, Kardas M, Lozinska L, Erlanson-Albertsson C, *et al.* Dietary thylakoids suppress blood glucose and modulate appetite-regulating hormones in pig exposed to oral glucose tolerance test. *Clinical Nutrition*. 2014; 33:1122-1126.
- Moon J, Do H-D, Kim OY, Shin M-J. Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 58:347-354.
- Moriarty RM, Naithani R, Surve B. Organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007; 7:827-838.
- Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Blany C. Exploring the effect of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Tibtech*. 1994; 12:493-501.
- Mui WWY, Durance TD, Scaman CH. Flavor and texture of banana chips dried by combinations of hot air, vacuum and microwave processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:1883-1889.
- Mújica-Paz H, Valdez-Fragoso A, Tonello-Samson C, Welti-Chanes J, Torres JA. High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*. 2011; 4:969-985.
- Mukherjee S, Gangopadhyay H, Das DK. Broccoli: A unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60:2768.
- Mullen W, Boitier A, Stewart A, Crozier. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: Analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatografia A*. 2004; 1058:163-168.
- Murashima M, Watanabe S, Zhuo X, Uehara M, Kurashige A. Phase I study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *BioFactors*. 2004; 22:271-275.
- ## N
- Nakayama H, Tsuge N, Sawada H, Higashi Y. Chronic intake of onion extract containing quercetin improved postprandial endothelial dysfunction in healthy men. *Journal of the American College of Nutrition*. 2013; 32:160-164.
- Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, *et al.* Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radical Biology and Medical*. 2003; 34:840-849.
- Navarro M, Verret C, Pardon P, El Moueffak A. Changes in volatile aromatic compounds of strawberry puree treated by high-pressure during storage. *High Pressure Research*. 2002; 22:693-696.
- Navarro-González I, Pérez-Sánchez H, Martín-Pozuelo G, García-Alonso J, Periago MJ. The

- inhibitory effects of bioactive compounds of tomato juice binding to hepatic HMGCR: *In vivo* study and molecular modelling. *PLoS ONE*. 2014; 9:e83968.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (Matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiological Reviews*. 2005; 85:1-31.
- Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, *et al.* Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: Potential implication of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition*. 2013; 109:802-809.
- Nguyen MT, Indrawati O, Hendrickx M. Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51:3352–3357.
- Nindo CI, Sun T, Wang SW, Tang J, Powers JR. Evaluation of drying technologies for retention of physical quality and antioxidants in asparagus (*Asparagus officinalis*, L.). *LWT-Food Science and Technology*. 2003; 36:507-516.
- Nishimura M, Ohkawara T, Kagami-Katsuyama H, Sato H, Nishihira J. Improvement of blood pressure, glucose metabolism, and lipid profile by the intake of powdered asparagus (Lú Sūn) bottom-stems and cladophylls. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2013; 4:250-255.
- Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*. 2004; 43:91–104.
- Ntambi JM. Regulations of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 1999; 40:1549–1558.
- O'Donoghue E, Somerfield SD, Shaw M, Bendall M, Hedderly D, *et al.* Evaluation of carbohydrates in Pukekohe Longkeeper and Grano cultivars of *Allium cepa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52:5383–5390.
- Oey I, Lille M, Van Loey A, Hendrickx M. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2008; 19:320-328.
- Oey I, Verlinde P, Hendrickx M, Van Loey A. Temperature and pressure stability of l- ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: a kinetic study. *European Food Research and Technology*. 2006; 223:71–77.
- Ogunmodede OS, Saalu LC, Ogunlade B, Akunna GG, Oyewopo AO. An evaluation of the hypoglycemic, antioxidant and hepatoprotective potentials of onion (*Allium cepa* L.) on alloxan-induced diabetic rabbits. *International Journal of Pharmacology*. 2012; 8: 21-29.
- Oikonomopoulou VP, Krokida MK. Novel Aspects of Formation of Food Structure during Drying. *Drying Technology*. 2013; 31:990-1007.
- Oms-Oliu G, Odriozola-Serrano I, Martín-Belloso O. The effects of non-thermal technologies on phytochemicals. En: *Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health*. 2012. Venketeshwer Rao (Ed.). ISBN: 978-953-51-0296-0.
- Ordovás JM, Kaput J, Corella D. Nutrition in the genomics era: Cardiovascular disease risk and

- the Mediterranean diet. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007; 51:1293-1299.
- Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, *et al.* Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radical Research*. 2001; 34:93-99.
- Ostrowska E, Gabler NK, Sterling SJ, Tatham BG, Jones RB, *et al.* Consumption of Brown onions (*Allium cepa* var. cavalier and var. density) moderately modulates blood lipids, haematological and haemostatic variables in healthy pigs. *British Journal of Nutrition*. 2004; 91:211-218.
- Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellstrom J, *et al.* Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*. 2008; 138:562-566.
- Overman A, Chuang CC, McIntosh M. Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *International Journal of Obesity*. 2011; 35:1165-1172.
- P**
- Packard RR, Lichtman AH, Libby P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology*. 2009; 31:5-22.
- Pan M-H, Lai C-S, Ho C-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*. 2010; 1:15-31.
- Pandey KB, Rizci SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2:270-278.
- Parada J, Aguilera JM. Food microstructure affects bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*. 2007; 72:R21-R32.
- Pashkow FJ. Oxidative stress and inflammation in heart disease: Do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? *International Journal of Inflammation*. 2011; 2011:1-9.
- Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, Butler F, Downey G. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental color of tomato and carrot purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2009; 10:16-22.
- Patterson MF, Linton M. "Pasteurización" de alimentos por altas presiones. Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos, pp. 59-72. Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud – Universidad de Burgos. Ed: International Marketing & Communication. 2010. ISBN: 978-84-7867-055-0.
- Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental Biology and Medicine*. 2006; 231:1287-1299.
- Pérez-Gregorio MR, Regueiro J, González-Barreiro R, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*. 2011; 22:1108-1113.
- Pérez-Vizcaino F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010; 31:478-494.
- Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M, Puertas B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59:11683-11689.
- Pita ML, Hoyos M, Martín-Lacave I, Osuna C,

- Fernandez-Santos JM, *et al.* Long-term melatonin administration increases polyunsaturated fatty acid percentage in plasma lipids of hypercholesterolemic rats. *Journal of Pineal Research*. 2002; 32:179–186.
- Plaza L, Sánchez-Moreno C, de Ancos B, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O, *et al.* Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT Food Science and Technology*. 2011; 44:834-839.
- Pompei A, Cordisco L, Raimondi S, Amaretti A, Pagnoni UM, *et al.* *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*. 2008; 14:280-286.
- Porretta S, Birzi A, Ghizzoni C, Vicini E. Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. *Food Chemistry*. 1995; 52:35-41.
- Posadas SJ, Caz V, Largo C, De la Gándara B, Matallanas B, *et al.* Protective effect of supercritical fluid Rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*. 2009; 44:383-389.
- Powolny AA, Singh SV. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer letters*. 2008; 269:305-314.
- Prakash D, Singh BN, Upadhyay G. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry*. 2007; 102:1389-1393.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:4290-4302.
- Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 2008; 451:904-913.
- Rasanayagam V, Balasubramaniam VM, Ting E, Sizer CE, Bush C, *et al.* Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*. 2003; 68:254-259.
- Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjana K, Knorr D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007; 47:69-112.
- Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*. 2001; 49:311–319.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signaling*. 2012; 24:981-990.
- Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *The FEBS Journal*. 2011; 278:4243-51.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26:1231–1237.
- Regier M, Mayer-Miebach E, Behnlian D, Neff E, Schuchmann HP. Influences of Drying and Storage of Lycopene-Rich Carrots on the Carotenoid Content. *Drying Technology*. 2005; 23:989-998.

- Regulska-Ilow B, Ilow R. The influence of quercetin on fatty-acid content in selected organs of rats on diets with fresh and oxidized fat. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2008; 17:15–26.
- Rehrah D, Ahmedna M, Yu J, Goktepe I, Hurley S, *et al.* Enhanced cholesterol-and triglyceride-lowering effect of West African green tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007; 87:1323–1329.
- Reis B, Martins M, Barreto B, Milhazes N, Garrido EM, *et al.* Structureproperty-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58:6986-6993.
- Rendón-Huerta JA, Juárez-Flores B, Pinos-Rodríguez JM, Aguirre-Rivera JR, Delgado-Portales RE. Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats. *Plant Food for Human Nutrition*. 2012; 67:64-70.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganda G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20:933–956.
- Ro JY, Ryu JH, Park HJ, Cho HJ. Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. *Springerplus*. 2015; 4:17.
- Roberfroid MB. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *Journal of Nutrition*. 2007; 137:2493S-2502S.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412:410-424.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412:410-24.
- Rodríguez Galdón B, Tascón Rodríguez C, Rodríguez Rodríguez EM, Díaz Romero, C. Fructans and major compounds in onion cultivars (*Allium cepa*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009; 22:25–32.
- Rodríguez-Alcalá LM, Fontecha J. Hot topic: Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: Evaluation after processing and storage. *Journal of Dairy Science*. 2007; 90:2083–2090.
- Rodríguez-Cantú LN, Gutiérrez-Urbe JA, Arriola-Vucovich J, Díaz-De La Garza RI, Fahey JW, *et al.* Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and extracts rich in glucosinolates and isothiocyanates affect cholesterol metabolism and genes involved in lipid homeostasis in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59:1095–1103.
- Rodríguez-Galdón B, Tascón Rodríguez C, Rodríguez Rodríguez E, Díaz Romero C. Organic acids contents in onion cultivars (*Allium cepa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 22:25-32.
- Roldán-Marín E, Jensen RI, Krath BN, Kristensen M, Poulsen M, *et al.* An onion byproduct affects plasma lipids in healthy rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58:5308–5314.
- Roldán-Marín E, Krath BN, Poulsen M, Binderup M-L, Nielsen TH, *et al.* Effects of an onion by-product on bioactivity and safety markers in healthy rats. *British Journal of Nutrition*. 2009; 102:1574–1582.
- Roldán-Marín E, Sánchez-Moreno C, Lloria R, De

- Ancos B, Cano MP. Onion high-pressure processing: flavonol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 2009b; 42:835–841.
- Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Products Report*. 2005; 22:351-368.
- Russo P, Adiletta G, Di Matteo M. The influence of drying air temperature on the physical properties of dried and rehydrated eggplant. *Food and Bioproducts Processing*. 2013; 91:249-256.
- ## S
- Sablani SS, Andrews PK, Davies NM, Walters T, Saez H, *et al.* Effects of Air and Freeze Drying on Phytochemical Content of Conventional and Organic Berries. *Drying Technology*. 2011; 29:205-216.
- Saénz T, García D, de la Puerta R. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*. 2002; 9: 687–693.
- San Martín MF, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002; 42:627-645.
- Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, *et al.* High-pressurized orange juice consumption affects plasma vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. *Journal of Nutrition*. 2003; 133:2204-2209.
- Sánchez-Moreno C, De Ancos B, Plaza L, Elez-Martínez P, Cano MP. Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2009b; 49:552–576.
- Sánchez-Moreno C, Jimenez-Escrig A, Martin A. Stroke: Roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants. *Nutrition Research Reviews*. 2009; 22:49-67.
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, Elez-Martínez P, de Ancos B, Martín-Belloso O, *et al.* Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:4403-4409.
- Sankhari JM, Thounaojam MC, Jadeja RN, Devkar RV, Ramachandran AV. Anthocyanin-rich red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extract attenuates cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. *Journal of Science and Food Agriculture*. 2012; 92:1688-1693.
- Santas J, Carbo R, Gordon MH, Almajano MP. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*. 2008; 107:1210–1216.
- Santos A, San Mauro M, Díaz DM. Prebiotics and their long-term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiology*. 2006; 23:498-503.
- Santos PHS, Silva MA. Retention of Vitamin C in Drying Processes of Fruits and Vegetables: A Review. *Drying Technology*. 2008; 26:1421-1437.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45:287–306.
- Schulz H, Krüger H, Liebman J, Peterka H. Distribution of Volatile Sulfur Compounds in an

- Interspecific Hybrid between Onion (*Allium cepa* L.) and Leek (*Allium porrum* L.). *Journal of Agricultural of Food Chemistry*. 1998; 46:5220-5224.
- Seo M-J, Lee Y-J, Hwang J-H, Kim K-J, Lee B-Y. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015; 11:1308-1316.
- Sheela CG, Augusti KT. Antiperoxide effects of S-allyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium sativum* Linn and guggulipid in cholesterol diet fed rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1995; 33:337-341.
- Shim SM, Yi HL, Kim YS. Bioaccessibility of flavonoids and total phenolic content in onions and its relationship with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2011; 62:835-838.
- Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Heshmatian B, Ilkhanizadeh B. Long-term ethanol consumption initiates atherosclerosis in rat aorta through inflammatory stress and endothelial dysfunction. *Vascular Pharmacology*. 2012; 57:72-77.
- Shofian NM, Hamid AA, Osman A, Saari N, Anwar F, *et al.* Effect of Freeze-Drying on the Antioxidant Compounds and Antioxidant Activity of Selected Tropical Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12:4678- 4692.
- Simões LO, Conceição-Filho G, Ribeiro TS, Jesus AM, Fregoneze JB, *et al.* Evidences of antihypertensive potential of extract from *Solanum capsicoides* All. in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine*. 2016; 23:498-508.
- Singh K, Singh N, Chandy A, Manigauha. *In vivo* antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 385-388.
- Siquet C, Paiva-Martins F, Lima J, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids - A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*. 2006; 40:433-442.
- Siri-Tarino PW, Chiu S, Bergeron N, Krauss R. Saturated fats versus polyunsaturated fats versus carbohydrates for cardiovascular disease prevention and treatment. *The Annual Review of Nutrition*. 2015; 35:517-543.
- Škerget M, Majhenič L, Bezjak M, Knez Z. Antioxidant, radical scavenging and antimicrobial activities of red onion (*Allium cepa* L) skin and edible part extracts. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2009; 23:435-444.
- Soliman GZA. Effects of nuts (pistachio or almonds) consumption on lipid profile of hypercholesterolemic rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012; 5:47-53.
- Souza GA, Ebaid GX, Seiva FRF, Rocha KHR, Galhardi CM, *et al.* N-acetylcysteine an allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 643269 – 643274.
- Srinivasan K, Sambaiah K. The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*. 1991; 61:364-369.
- Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation

- and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33:1026-1036.
- Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, *et al.* Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2009; 296:H1281-H1288.
- Stoner L, Lucero AA, Palmer BR, Jones LM, Young JM, *et al.* Review: Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 2013; 46:1353-1371.
- Sudhahar V, Kumar SA, Mythili Y, Varalakshmi P. Remedial effect of lupeol and its derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stress. *Nutrition Research*. 2007; 27:778-787.
- Sumitani H, Suekane S, Nakatani A, Tatsuka K. Changes in Composition of Volatile Compounds in High Pressure Treated Peach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994; 42:785-790.
- T**
- Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2005; 25:2255-2264.
- Takahashi Y, Ohta H, Yonei H, Ifuku Y. Microbicidal effect of hydrostatic pressure on Satsuma mandarin juice. *International Journal of Food Science and Technology*. 1993; 28:95-102.
- Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. George Lyman Duff memorial lecture; lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2000; 20:1185-1188.
- Teyssier C, Amiot M-J, Mondy N, Auger J, Kahane R, Siess M-H. Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolizing enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. 2001; 39:981-987.
- Tokaç M, Taner G, Aydin S, Ozkardeş AB, Dündar HZ, *et al.* Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 61:28-35.
- Torres C, Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I, Pérez-Coello MS. Effect of freeze-drying and oven-drying on volátiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*. 2010; 660:177-182.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidant & Redox Signaling*. 2008; 10:1343-1374.
- Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J, Martínez-González MA, Covas MI, *et al.* Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2013; 23:953-959.
- Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, *et al.* Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008; 197:50-56.
- Tseng A, Zhao Y. Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive

- compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). *Journal of Food Science*. 2012; 77:H192–H201.
- Tsuge K, Kataoka M, Seto Y. Determination of S-methyl-, S-propyl-, and S-propenyl-L-cysteine sulfoxides by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butyldimethylsilylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:4445–4451.
- Tzounis X, Rodríguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, *et al.* Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 93:62-72.
- Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, *et al.* Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*. 2008; 99:782-792.
- ## U
- Umakoshi H, Tanabe T, Suga K, Bui HT, Shimanouchi T, *et al.* Oxidative stress can affect the gene silencing effect of DOTAP liposome in an *in vitro* translocation system. *International Journal of Biological Sciences*. 2011; 7:253-260.
- USDA Food Composition Databases. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3030?manu=&fgcd=Vegetables%20and%20Vegetable%20Products&ds=>
- Uzun FG, Kalender Y. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food Chemical Toxicology*. 2013; 55:549-556.
- ## V
- Valdez-Fragoso A, Mújica-Paz H, Welti-Chanes J, Torres JA. Reaction Kinetics at High Pressure and Temperature: Effects on Milk Flavor Volatiles and on Chemical Compounds with Nutritional and Safety Importance in Several Foods. *Food and Bioprocess Technology*. 2011; 4:986-995.
- Van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WM. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49:3606–3613.
- Van Eylen D, Bellostas N, Strobel BW, Oey I, Hendrickx M, *et al.* Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv *Italica*) heads. *Food Chemistry*. 2009; 112:646–653.
- Vauzour D, Rodríguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2010; 2:1106-1131.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 103:1355-1367.
- Vázquez-Gutiérrez JL, Plaza L, Hernando I, Sánchez-Moreno C, Quiles A, de Ancos B, Cano MP. Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & Function*. 2013; 4:586-591.
- Verlinde P, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A. High-pressure treatments induce folate polyglutamate

- profile changes in intact broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv. Italica) tissue. *Food Chemistry*. 2008; 111:220–229.
- Viejo J, García-Linares MC, Bastida S, García-Arias MT, Sánchez-Muniz FJ. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Science and Technology International*. 2003; 9:329–338.
- Viljanen K, Lille M, Heiniö R-L, Buchert J. Effect of high-pressure processing on volatile composition and odour of cherry tomato purée. *Food Chemistry*. 2011; 129:1759-1765.
- Viry E, Anwar A, Kirsch G, Jacob C, Diederich M, *et al.* Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *International Journal of Oncology*. 2011; 38:1103-1111.
- Visioli F, Davalos A. Polyphenols and cardiovascular disease: A critical summary of the evidence. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011; 11:1186-1190.
- Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, *et al.* Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science*. 2011; 90:566-578.
- Vutharadhi S, Jolapuram U, Kodidhela LD. Nutraceutical inherent of *Spinacia olearea* Linn. methanolic leaf extract ameliorates isoproterenol induced myocardial necrosis in male albino Wistar rats via mitigating inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 85:239-247.
- Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*. 2012; 38:76-87.
- Williamson G, Barron D, Shimoi K, Terao J. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Research*. 2005; 39:457-469.
- Wilson EA, Demming-Adams B. Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. *Nutrition and Food Science*. 2007; 37:178-183.
- Witrowa-Rajchert D, Rzaca M. Effect of Drying Method on the Microstructure and Physical Properties of Dried Apples. *Drying Technology*. 2009; 27:903-909.
- Wolbang CM, Fitos JL, Treeby MT. The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2008; 9:196-200.
- X
- Xiao D, Li M, Herman-Antosiewicz A, Xiao H, Lew KL, *et al.* Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing Akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGF-R2. *Nutrition and Cancer*. 2006; 55:94-107.
- Xu HS, Zhang M, Duan X, Mujumdar AS, Sun JC. Effect of Power Ultrasound Pretreatment on Edamame Prior to Freeze Drying. *Drying Technology*. 2009; 27:186-193.
- Y
- Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A

W

review. *Clinical Chimical Acta Journal*. 2010; 411:1570-1579.

Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, *et al.* Molecular mechanism of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23:1996-2001.

Z

Zainol M, Khairi M, Abdul-Hamid A, Abu Bakar F, Pak Dek MS. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*. 2009; 16:531-537.

Zhang Y, Guo W, Wen Y, Xiong Q, Liu H, *et al.* SCM-198 attenuates early atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits via modulation of the inflammatory and oxidative stress pathways. *Atherosclerosis*. 2012; 224:43-50.

Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochemical Research*. 2009; 34:630-638.

Zhou Y, Zhuang W, Hu W, Liu GJ, Wu TX, *et al.* Consumption of large amounts of *Allium* vegetables reduces risk for gastric cancer in meta-analysis. *Gastroenterology*. 2011; 141:80-9.

Zielinska D, Wiczowski W, Piskula MK. Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56:3524-3531.

